Theoretische Untersuchung zur inhibitorischen Wirkung von Methotrexat-Analoga anhand der Dihydrofolat-Reduktase-Kristallstruktur

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

von
Peter Zunker
aus Wittlich

Frankfurt am Main
1984

UNIV.
LEEDS
LIBR.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538120_0001

THEORETISCHE UNTERSUCHUNG ZUR INHIBITORISCHEN WIRKUNG VON METHOTREXAT-ANALOGA AN HAND DER DIHYDROFOLAT-REDUKTASE-KRISTALLSTRUKTUR

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

von
PETER ZUNKER
aus Wittlich

Frankfurt am Main
1984

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 1980 bis August 1983 im Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje angefertigt.

Das Thema dieser Arbeit wurde mir von Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje überlassen. Bei allen auftretenden Fragen und Problemen war er stets ein bereitwilliger, verständnisvoller Ratgeber und Diskussionspartner. Hierfür und für die angenehme Zusammenarbeit danke ich ihm sehr herzlich. Ebenso danke ich Prof. Dr. G. Miehe und Dr. J.W. Bats vom Institut für Kristallographie der Universität Frankfurt, die mir bei Fragen zu kristallographischen Themen bereitwillig Auskunft gaben.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Biochemie,
Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Dekan: Prof. Dr. Dr. E. Mutschler
1. Gutachter: Prof. Dr. H.-D. Höltje
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Rüterjans

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Februar 1984

Vom logischen Standpunkt aus hat die Wissenschaft den Begriff Wahrheit weder nötig, noch vermag sie ihn zu bilden. Für jede Forschung sind metaphysisch neutrale Begriffe wie Bestätigung, Verfälschung, Übereinstimmung mit der Erfahrung, Wahrscheinlichkeit usw. ausreichend.

L. Kolakowski

GLIEDERUNG

		Seite
A	EINLEITUNG	1
A1	Geschichtlicher Überblick	1
A2	Die physiologische Bedeutung der Dihydrofolat-Reduktase	3
A3	Bedeutung und Selektivität von Inhibitoren der DHFR	10
A4	Strukturen der Dihydrofolat-Reduktasen	12
A4.1	Sequenzenanalysen	12
A4.2	Röntgenstrukturanalysen	13
A4.3	Die Struktur der L.casei Dihydrofolat-Reduktase	15
A5	Die Katalyse	20
B	PROBLEMSTELLUNG	25
B1	Thema der Arbeit	25
B2	Allgemeine Bemerkungen	31
C	DURCHGEFÜHRTE ARBEITEN	32
C1	Darstellung des aktiven Zentrums	32
C2	Die Atomkoordinaten der Aminosäuren und Inhibitoren	39
C2.1	Geometrieüberprüfung und ihr Einfluß auf die Ladungsverteilung	39
C2.2	Die Positionierung der Wasserstoffe	45
C2.3	Der Aufbau der Inhibitorkoordinaten	46
C2.4	Der Einbau der Inhibitoren in das aktive Zentrum	47
C3	Wasserstoffbrückensysteme und Ladungen innerhalb von Proteinkomplexen	49
C4	Die beiden Modelle des Wechselwirkungskomplexes	56

C5 Berechnung der WWE zwischen aktivem Zentrum und den Liganden 61
C5.1 Berechnung der WWE mit der Programmfolge IEHT, MOMENT, INTOC 61
C5.2 Eine empirische Formel zur Berechnung der WWE 63
C5.2.1 Überprüfung des Programmes zur Berechnung der WWE 69
C5.2.2 Berechnung der WWE nach der empirischen Formel 71

D DISKUSSION DER ERGEBNISSE 76

E ZUSAMMENFASSUNG 89

F EIN WECHSELWIRKUNGSMODELL MIT DREI BINDUNGS-STELLEN 90

G ANHANG 95

H LITERATUR 125

A EINLEITUNG

A1 Geschichtlicher Überblick

Die Folsäure (Pteroylglutaminsäure), das Substrat der Dihydrofolat-Reduktase, wurde erstmals 1938 aus Leberextrakten und 1947 aus Spinatblättern isoliert (Abb. I).[1,2] Auf die Dihydrofolat-Reduktase wurde man erst aufmerksam, als der Einfluß der ersten Folsäureantagonisten, 2,4-Diaminopyrimidine und Aminopterin, auf das Wachstum von Bakterien und den Verlauf maligner Erkrankungen untersucht wurde (Abb. 1).[3,4] 1950 konnten Nichol und Welch die Hemmung der Umwandlung von Folsäure zu N5-Formyltetrahydrofolsäure, auch Leucovorin oder Citrovorum-Faktor genannt, nachweisen.[5] Später gelang der Nachweis, daß, bevor eine Formylierung zu Leucovorin erfolgt, zuerst eine Reduktion der Folsäure zu Tetrahydrofolsäure stattfinden muß.[6] 1957 konnte Sidney Futterman aus Hühnerleber eine teilweise gereinigte Dihydrofolat-Reduktase gewinnen.[7] Das Enzym ist in der Natur weit verbreitet und konnte in prokaryontischen und eukaryontischen Organismen nachgewiesen werden.[8]

Anfang der sechziger Jahre gelang es, Enzyme verschiedener Spezies einer teilweisen Reinigung zu unterziehen, die große Unterschiede in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren offenbar werden ließen.[9,10] Von der großen Anzahl der Inhibitoren haben einige erhebliche Bedeutung in der Therapie erlangt. So wird Pyrimethamin gegen Malaria, Trimethoprim bei bakteriellen Infekten und Methotrexat bei malignen und Erkrankungen des Autoimmunsystems eingesetzt (Abb. 1, Abb. 6).[11,12]

Zu Beginn der siebziger Jahre verliefen Versuche der Isolierung der reinen Enzyme unterschiedlicher Herkunft in

mehreren Laboratorien erfolgreich.[13-15] Der Isolierung schlossen sich sehr schnell Analysen der Primärstruktur und Bestimmungen der Molekulargewichte der Proteine an.[16-20] Mit dem Ziel, Röntgenstrukturanalysen durchführen zu können, wurde gleichzeitig damit begonnen, verschiedene Enzym-Inhibitor-Komplexe (mit und ohne Coenzym), kristallin zu gewinnen. 1978 wurden die ersten Röntgenstrukturanalysen der Dihydrofolat-Reduktasen von Lactobacillus casei und Escherichia coli veröffentlicht.[21-23] Bis heute sind diese noch optimiert und Kristallstrukturen von Enzymen gleicher oder verschiedener Herkunft mit anderen Inhibitoren untersucht worden.[24,25]

In zahlreichen Veröffentlichungen sind für die Inhibitoren quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen publiziert worden.[26-31] Das Hauptinteresse richtet sich heute auf den Unterschied zwischen den Dihydrofolat-Reduktasen verschiedener Spezies und die Untersuchung der Bindung der Inhibitoren in den aktiven Zentren der Enzyme.[32]

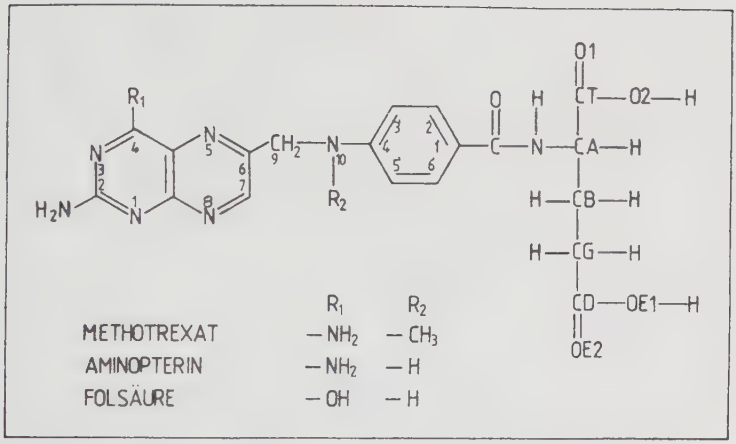


Abb. 1 Formeln und Kennzeichnung der Atome von Methotrexat, Aminopterin und Folsäure

A2 Die physiologische Bedeutung der Dihydrofolat-Reduktase

Die Hauptaufgabe des Enzyms liegt in der Reduktion von 7,8-Dihydrofolsäure zu 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure, wobei NADPH als Coenzym fungiert (Abb. 2). In geringem Umfange katalysiert das Enzym auch die Reduktion von Folsäure zu 7,8-Dihydrofolsäure (DHF). Diese Reaktion verläuft bei Hydrogenasen von Vertebraten 4 - 10 mal langsamer als die erstere. Bei Enzymen von Bakterien ist sie zu vernachlässigen. Das pH-Optimum zur Reduktion von DHF liegt bei pH 7, das zur Reduktion von Folsäure bei pH 4,5.[33-35]

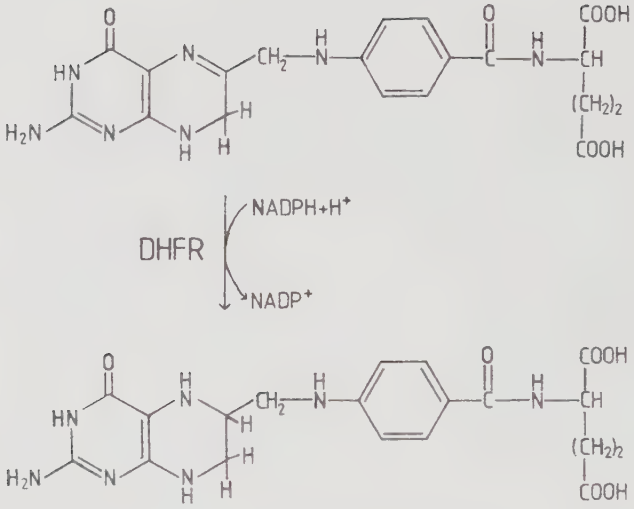
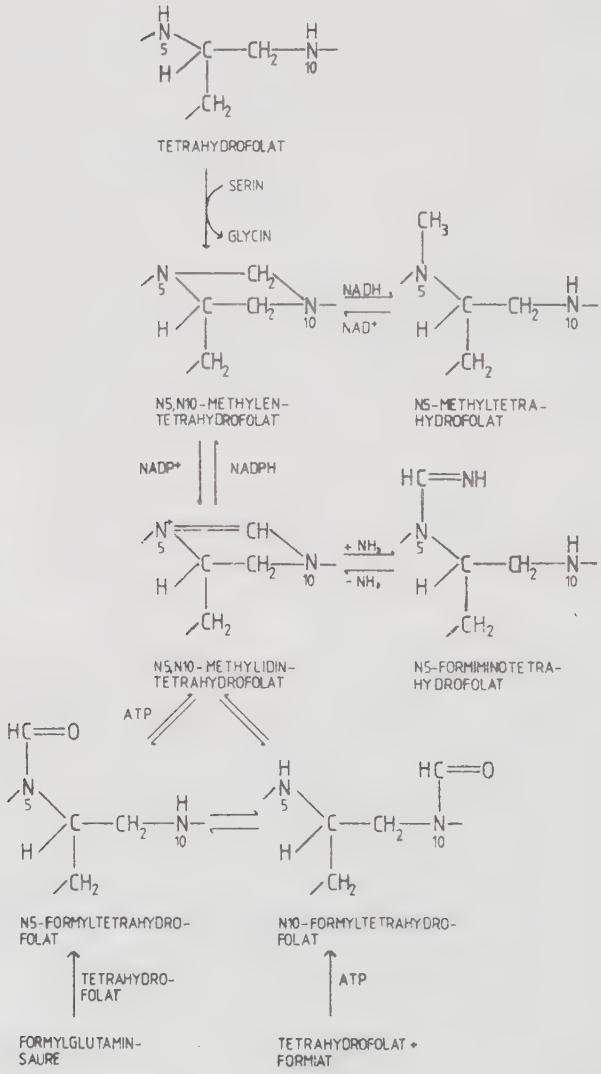


Abb. 2 Reduktion der 7,8-Dihydrofolsäure zur 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure durch die Dihydrofolat-Reduktase

Das Endprodukt der Reaktion Tetrahydrofolsäure (THF) spielt im Stoffwechsel als aktives Coenzym eine sehr wichtige Rolle bei der Übertragung von Ein-Kohlenstoff-Einheiten. THF dient als Akzeptor des ß-Kohlenstoffatoms von Serin, welches in einer Pyridoxalphosphat erfordernden Reaktion gespalten wird und Glycin ergibt (Abb. 3).[33] Das auf diese Weise von Serin entfernte Kohlenstoffatom bildet zwischen den Stickstoffatomen N5 und N10 der THF eine Methylenbrücke aus, wobei N5,N10-Methylentetrahydrofolsäure entsteht (Abb. 3).[33]

Über verschiedene Stoffwechselschritte kann das aktive Folsäure-Coenzym N5,N10-Methylentetrahydrofolsäure modifiziert, und zur Übertragung von Methyl-, Hydroxymethyl-, Formyl- sowie Formiminogruppen bereitgestellt werden. Unter Verbrauch von $NADP^+$ ist eine Oxidation der Verbindung zu N5,N10-Methylidintetrahydrofolsäure möglich. Diese Substanz gehört nicht, wie die obigen, zur Familie der aktiven Folsäure-Coenzyme. Jedoch entsteht bei der Hydrolyse das aktive Coenzym N10-Formyltetrahydrofolsäure. Die Formyl-Gruppe kann auch unter Verbrauch von ATP mit Hilfe von Ameisensäure direkt auf THF übertragen werden. Ein weiteres formyliertes Derivat der THF, N5-Formyltetrahydrofolsäure, kann durch Isomerisierung aus N10-Formyltetrahydrofolat oder durch Übernahme der Formyl-Gruppe von Formylglutaminsäure hervorgehen. Die N5-Position wird zum Transfer der Formimino-Gruppe benötigt, wobei Formimino-Derivate entstehen, wie z.B. Formiminoglycin, eine Vorstufe der Purine (Abb. 3).[33]

Abb. 3 Die Folsäure-Coenzyme. (A. Lehninger, Biochemie, Verlag Chemie, Weinheim 1975)



Bei der Betrachtung der biochemischen Wege, an denen THF-Coenzyme beteiligt sind, wird fast immer in einer Art Pendelmechanismus eine Ein-Kohlenstoff-Einheit aufgenommen oder abgegeben. In quantitativer Hinsicht ist dabei die Übertragung von Methyl-Gruppen auf Homocystein am bedeutungsvollsten (Abb. 4).[33,36]

Eine Ausnahmereaktion wird von der Thymidilat-Synthetase katalysiert. Bei dieser Reaktion fungiert das aktive Coenzym N5,N10-Methylentetrahydrofolat, nicht nur als Methyl-, sondern auch als Wasserstoffdonator (Abb. 4, Abb. 5). Nach Übertragung der Methyl-Gruppe entsteht nicht THF, sondern DHF. Damit die Konzentration an THF in der Zelle nicht absinkt, muß das entstandene DHF mit Hilfe der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) und seines Coenzyms NADPH wieder zu THF reduziert werden.[33,36]

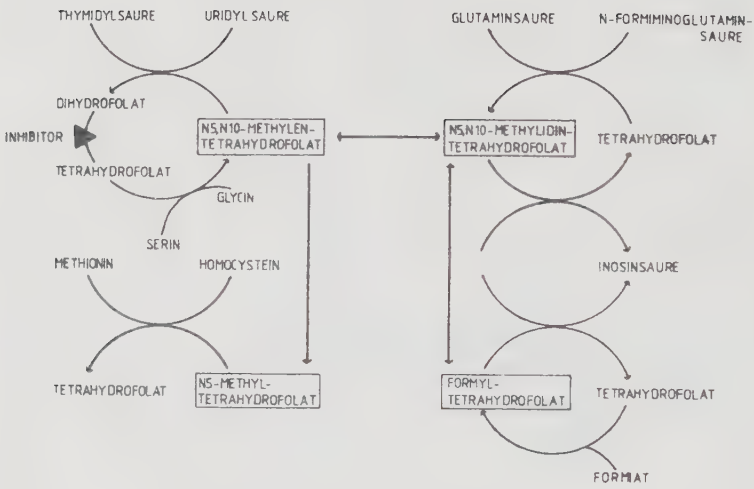


Abb. 4 Schematische Darstellung der Biosynthesen, an denen THF oder THF-Derivate beteiligt sind. Der Eingriff von DHFR-Inhibitoren in die Biosynthese ist gekennzeichnet. (in Anlehnung an: G.H. Hitchings, B. Roth, Enzyme Inhibitors as Drugs, M. Sandler, Ed., University Park Press, Baltimore, 1980)

Wird die DHFR inhibiert, so führt dies zum Absinken der Konzentration an Tetrahydrofolat-Coenzymen und somit zur Störung der Übertragung an Ein-Kohlenstoff-Einheiten. Die Hauptfolgen und physiologischen Konsequenzen aus der Blockade der DHFR sind die Einstellung der Synthese von Purinen, Pyrimidinen, Aminosäuren.[8,35,36,37]
Die wichtigste Läsion für die Zelle scheint dabei der Man-

gel an Thymidin zu sein.[37] Zellkulturen, deren DHFR gehemmt wird, bleiben bei der Teilung zwischen Meta- und Anaphase stehen.[38]

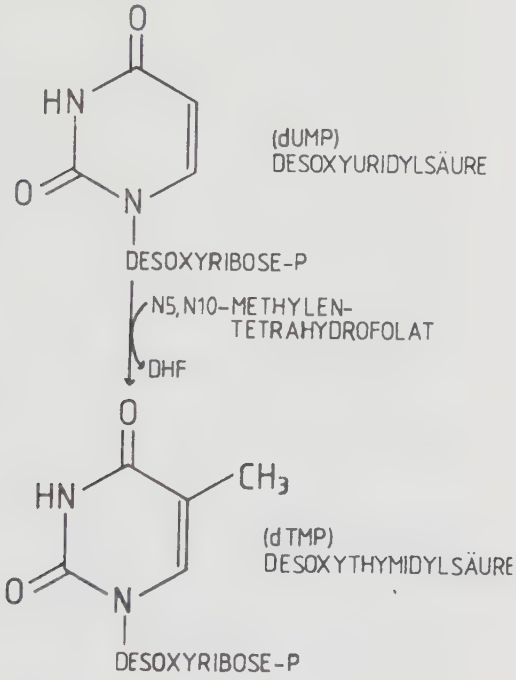


Abb. 5 Reaktion der Thymidilat-Synthetase unter Verbrauch von N5,N10-Methylentetrahydrofolat und Bildung von dTMP und DHF

A3 Bedeutung und Selektivität von Inhibitoren der DHFR

Die erste Substanz, die als Antimetabolit der Folsäure Einzug in die Therapie hielt, war Aminopterin (Abb. 1). Sie wurde wirksam gegen Leukämie eingesetzt.[4] Heute spielt Methotrexat (MTX) als Folsäureantagonist bei der Behandlung von Leukämien, Chorionepitheliom, anderen malignen Erkrankungen sowie bei Autoimmunkrankheiten eine bedeutende Rolle (Abb. 1).[11,12] Substanzen mit anderem Grundkörper, ebenfalls DHFR-Inhibitoren besitzen eigene Indikationen. Pyrimethamin (PYR) findet Anwendung gegen Malaria (Abb. 6). Diese Substanz wirkt gegen Gewebs- und Blutschizonten. Außerdem ist sie noch sporontozid. In Kombination mit Sulfadoxin, einem Langzeit-Sulfonamid, kann der Wirkungsgrad der Verbindung gesteigert sowie der Resistenzentwicklung der Erreger entgegengewirkt werden.[11,12] Ein Kombinationspräparat aus diesen Substanzen ist FANSIDAR^{R}.
Eingang in die Therapie, inbesondere von Harnwegsinfektionen, hat Trimethoprim (TMP) gefunden; eine Substanz, die gegen gramnegative und grampositive Keime wirkt (Abb. 6). Bei TMP hat sich ebenfalls eine Kombination mit Sulfonamiden als sinnvoll erwiesen. Die Präparate BACTRIM^{R}, DRYLIN^{R} oder SIGAPRIM^{R} erhalten zusätzlich zum TMP noch ein Mittelzeitsulfonamid. Durch die Kombination mit Sulfonamiden wird nicht nur die DHFR, sondern auch die Synthese der Folsäure selbst bei den Mikroorganismen gehemmt.[9,11,]

Der differenzierte Einsatz der Inhibitoren beruht auf der unterschiedlichen Affinität der Verbindungen zur DHFR verschiedener Spezies. TMP besitzt zur DHFR von Bakterien eine etwa 3×10^4 höhere Affinität als zur menschlichen.[8,10] Dies führt dazu, daß diese Substanz auf Bakterien sehr

toxisch und bakteriostatisch wirkt, den menschlichen Organismus aber kaum negativ beeinflußt.[9,10,11]

Pyrimethamin besitzt nur schwache Affinitäten zur DHFR von Bakterien und Säugetieren aber eine sehr hohe zur DHFR von Plasmodium berghei (Tab. 1).[8,9,39] Über die hohe Affinität zur DHFR von Plasmodien ist auch der Erfolg dieser Substanz bei der Bekämpfung von Malaria zu erklären.[9]

Methotrexat weist nicht die hohe Selektivität kleiner Inhibitoren gegenüber der DHFR von verschiedenen Spezies auf (Tab. 1). Der Grund dafür ist wohl die nahe Strukturverwandtschaft mit dem Substrat des Enzyms, der Dihydrofolsäure.[8]
Neben den Inhibitoren mit einem Pteridin- oder Pyrimidin-Grundgerüst gibt es noch solche mit einem Triazin- oder Pyridopyrimidin-Grundkörper. Bei all diesen Substanzen scheint für eine hohe inhibitorische Wirkung das Vorhandensein einer 2,4-Diaminopyrimidin-Teilstruktur wesentlich zu sein (Abb. 6).[8]
Eine Hemmung der DHFR ist auch mit Ba^{2+} möglich. In diesem Fall wird zur Erklärung der Inhibitorwirkung eine Wechselwirkung mit den Carboxylgruppen des aktiven Zentrums angenommen.[40]

Tab. 1 pI_{50}-Werte für MTX, TMP und PYP für die DHFR verschiedener Spezies

Subst.	menschl.Leber	E.coli	P.vulgaris	P.berghei
MTX	9×10^{-8}	0.6×10^{-8}	0.5×10^{-8}	----
TMP	3×10^{-4}	0.5×10^{-8}	0.4×10^{-8}	----
PYR	1.8×10^{-6}	2.5×10^{-5}	1.5×10^{-5}	5×10^{-10}

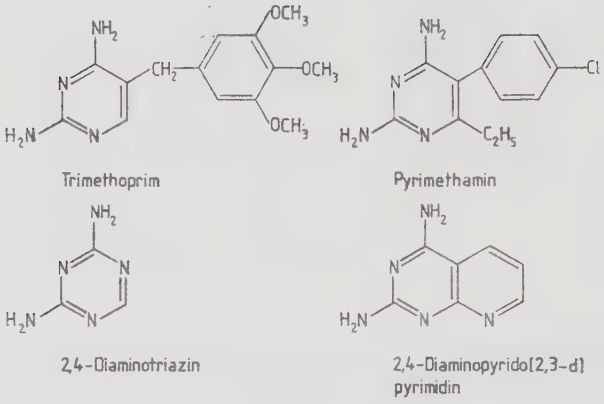


Abb. 6 DHFR-Inhibitoren

A4 Die Strukturen der Dihyprofolat-Reduktasen

A4.1 Sequenzanalysen

Sequenzen und Teilsequenzen einer Reihe von Dihydrofolat-Reduktasen sind heute verfügbar.
Es sind untersucht die Primärstrukturen verschiedener Stämme von E.coli (RT 500, MB 1428). Das Protein besteht aus 159 Aminosäuren. Die Dihydrofolat-Reduktasen der beiden Stämme unterscheiden sich nur in 3 von 159 Positionen.[20,41,42,43]
Das Enzym von L.casei besteht aus 162 Aminosäuren. Von dieser Hydrogenase, analysiert in verschiedenen Laboratorien,

sind keine unterschiedlichen Primärstrukturen bekannt. Fraglich ist nur, ob sich an Position 8 Asparaginsäure,[16,18] oder Asparagin befindet.[19]
Die DHFR von Streptococcus faecium ist ebenfalls untersucht und weist 167 Aminosäuren auf.[44]
Auffallend ist die geringe Homologie in den Sequenzen der Bakterienenzyme. Sie beträgt nur ungefähr 25 %. Die Strukturen von L.casei und St.faecium sind noch am ähnlichsten. In diesem Fall sind 30 der ersten 50 Aminosäuren identisch, und insgesamt beträgt der Anteil an homologen Strukturen 30 %.[18]

Die Primärstrukturen der tierischen Dihydrofolat-Reduktasen weisen einen hohen Grad an Übereinstimmung auf. So besitzen die Reduktasen von Mäuse-Lymphom L1210-Zellen und aus der Schweineleber beide 186 Aminosäuren.[17,45,46]. Die Enzyme aus Rinderleber und Hühnerleber weisen 185 bzw. 189 Aminosäuren auf.[47,48]
Die bakteriellen und tierischen Dihydrofolat-Reduktasen differieren auch in ihrem Molekulargewicht. Erstere besitzen ein Molekulargewicht von ungefähr 18 000, während die tierischen mit etwa 30 Aminosäuren mehr ein Molekulargewicht von 22 000 aufweisen.[25]

A4.2 Röntgenstrukturanalysen

Die Kristalle von L.c. und E.c. besitzen die hexagonalbipyramidale Raumgruppe $P6_1$.[25,49] Der L.c. Kristall, mit einem Molekül pro asymmtrische Einheit, weist die Zellparameter a=b=71.86Å, c=93.38Å auf.[49] Die DHFR-MTX bzw. DHFR-TMP Kristalle von E.c. besitzen mit a=b=93.22, c=73.56Å bzw. a=b=93.6Å, c=73.9Å nahezu identische Zellparameter und enthalten zwei Moleküle pro asymmetrische Einheit.[24,49] Der DHFR-NADPH-Triazin-Komplex aus Hühner-

leber gehört mit den Parametern a=89.0Å, b=48.3Å, c=64.0Å sowie ß=125.2° der monoklinen Raumgruppe C2 an. Wie im L.c. Kristall enthält die asymetrische Einheit ein Molekül.[25]

Die Röntgenstruktur des DHFR-MTX-Komplexes wurde erstmals 1977 publiziert mit einer Auflösung von 2.5Å.[23] Ein Jahr später erfolgte die Veröffentlichung des DHFR-NADPH-MTX-Komplexes ebenfalls mit einer Auflösung von 2.5Å und einem kristallographischen r-Faktor von 0.49.[21]

Der Wert der Auflösung d ist für die Röntgenstruktur ein Kriterium der Schärfe der Messung. Sie ist abhängig von der Wellenlänge der Röntgenstrahlung λ und dem gemessenen Beugungsmaximum θ. (Gl. 1)

$$d = \frac{\lambda}{2 \sin\theta} \qquad \text{(Gl. 1)}$$

$\sin\theta$ kann nie den Wert größer 1 annehmen, was bedeutet, daß die Auflösung maximal den Wert $\lambda/2$ annehmen kann. Für eine Wellenlänge der Röntgenstruktur von 1Å kann die Auflösung maximal 0.5 betragen. Eine Auflösung von 1.7Å hat z.B. zur Folge, daß Atome, die weiter als 1.7Å voneinander entfernt sind, unabhängig voneinander über ihre Reflexe bestimmt werden können. Für Atome die unterhalb dieses Abstandes zusammenliegen, ist eine direkte Bestimmung aufgrund der erhaltenen Reflexe nicht möglich.[50,51]

Der r-Faktor wird wie folgt definiert:

$$r(F) = \frac{\sum \left| |F(obs)| - |F(calc)| \right|}{\sum |F(obs)|} \qquad \text{(Gl. 2)}$$

F gibt die Wurzel über die gemessene, $F_{(obs)}$ bzw. berechnete, $F_{(calc)}$ Intensität der Strahlung wieder. Es findet also ein Vergleich statt zwischen den beobachteten Intensitäten und den über das Modell theoretisch berechneten Intensitäten. Je besser die berechneten Intensitäten mit den gemessenen in Übereinklang sind, um so besser ist die Qualität der Röntgenstruktur und um so kleiner ist der r-Faktor.

Beide obengenannten Strukturen des DHFR-MTX-Komplexes sind mittlerweile in ihrer Geometrie optimiert. Sie sind verfügbar in einer Auflösung von 1.7 Å sowie einem für so große Moleküle ausgezeichneten r-Faktor von 0.15. Die mittlere Unsicherheit in der Festlegung der Koordinaten der Atome beträgt in dieser Struktur nur 0.15Å.[49]
Die Struktur des DHFR-TMP-Zweierkomplexes mit einer Auflösung von 2,8 Å wurde 1981 veröffentlicht.[24]
Die erste Struktur einer tierischen Dihydrofolat-Reduktase (Hühnerleber) wurde 1982 von Volz et.al. publiziert. Sie beschreibt den Dreierkomplex DHFR-NADPH mit einem Phenyltriazinderivat und besitzt eine Auflösung von 2.9Å.[25]

Beim Vergleich aller vier Röntgenstrukturen ist die hohe Übereinstimmung in der Sekundär- und Tertiärstruktur erstaunlich, trotz einer Sequenzhomologie unter 30 %. Alle weisen die Geometrie eines 8-strängigen ß-Blattes auf mit sieben parallelen und einem antiparallelen Strang sowie 4 Helices.[24,25,49]

A4.3 Die Struktur der L.c. Dihydrofolat-Reduktase

Wie zuvor erwähnt weisen die Strukturen der verschiedenen Dihydrofolat-Reduktasen in ihrer Sekundär-und Tertiärstruktur sehr große Ähnlichkeiten auf. Im folgenden soll daher

nur der DHFR-NADPH-MTX-Komplex von L.c. näher betrachtet werden.
Das 8-strängige ß-Blatt besteht aus 7 parallelen und einem antiparallen-COOH terminalen Strang. Über Schleifen sind 4 helikale Bereiche mit dem ß-Blatt verknüpft. Nach der Nomenklatur von Levitt und Chothia wird die DHFR zur Klasse der α/β Proteine gezählt (Abb. 7).[49,52] Der Anteil der Aminosäuren am ß-Blatt beträgt 35 %, der an den helikalen Bereichen 25 % (Tab. 2).

Als Folge der Optimierung wurden einige Besonderheiten in der Proteinstruktur entdeckt, auf die etwas näher eingegangen werden soll.
In der Struktur treten 2 cis-Peptidbindungen auf, die aufgrund ihres höheren Energieinhaltes selten sind.[49,53]
Eine solche cis-Peptidbindung findet sich zwischen Gly 98, Gly 99. Dieses Strukturmerkmal wurde auch bei allen anderen Dihydrofolat-Reduktasen an vergleichbarer Stelle gefunden.
Eine zweite cis-Bindung tritt zwischen Arg 52 und Pro 53 auf.[49]
Weitere interessante Strukturmerkmale sind Störungen im Wasserstoffbrückenmuster des ß-Blattes. Diese Aufweitungen der Struktur (engl. ß-bulge) sind Bereiche zwischen zwei aufeinanderfolgenden ß-typischen Wasserstoffbrücken, die zwei Aminosäuren auf dem einen Strang und nur eine einzelne Aminosäure auf dem anderen Strang beinhalten.[54] Eine klassische Struktur dieser Art, gebildet zwischen zwei antiparallelen Strängen, zeigt sich zwischen Val 139, Ser 140 (ßG) und Val 157 (ßH). Seltsamerweise ist dieses Charakteristikum in der DHFR von Hühnerleber vollkommen aufgehoben, und an seiner Stelle sind 6 Aminosäuren in den ßG Strang eingefügt. Eine zweite Aufweitung, diesmal zwischen parallelen Strängen, wird gebildet von Ala 97, Gly 98 (ßE) und Gly 42 (αC). In diesem Falle ist der Carbonylsauerstoff des Ala 97 vom ß-Blatt weg und zum Substrat hin ge-

richtet. Eine dritte Aufweitung erscheint zwischen Asp 111, Thr 112 (βF) und Thr 1 (βA).[49]

An den Helices ist die Tatsache auffallend, daß die Carbonylsauerstoffe, nicht wie bei einer αHelix üblich, parallel zur Helixachse liegen,[53] sondern geringfügig nach außen geneigt sind. Als Erklärung für diesen Zustand wird das Bestreben der Carbonylsauerstoffe, die von Lösungsmittel umgeben sind, angegeben, einen höheren Hydratationsgrad zu erlangen.[49]

In der Struktur treten 15 Schleifen (engl. hairpin turns) auf. Unter einer solchen Schleife versteht man Wendungen, die aus vier beliebigen Aminosäuren bestehen, wobei der Abstand zwischen C n und C n+3 kleiner als 7Å ist und die Aminosäuren nicht der gleichen Helix angehören dürfen. Interessant an diesen Strukturen ist wiederum die Tatsache, daß 6 von 9 Einschiebungen oder Auslassungen an Aminosäuren, welche tierische von bakteriellen Enzymen unterscheiden, mit diesen Schleifen zusammenfallen.[49]

Tab. 2 Die Aminosäuren des ß-Blattes und der α-Helices

ß-Blatt	Helix	Sequenz-Nr.
ßA		1 - 7
	αB	23 - 34
ßB		36 - 42
	αC	42 - 49
ßC		56 - 63
ßD		74 - 76
	αE	78 - 89
ßE		93 - 98
	αF	99 - 107
ßF		111 - 119
ßG		135 - 145
ßH		152 - 161

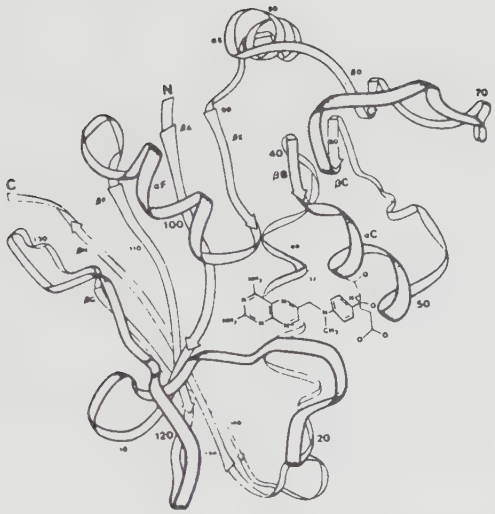


Abb. 7 DHFR-Faltstruktur zusammen mit dem Inhibitor MTX (J.T. Bolin, D.J. Filman, D.A. Matthews, R.C. Hamlin, J. Kraut, J. Biol. Chem.257, 13653 (1982))

Das aktive Zentrum wird dargestellt durch eine 15Å tiefe Höhlung, die fast das ganze Enzym durchstößt (Abb. 7). Innerhalb der Sekundärstrukturen, die am Aufbau der Bindungsstelle des Substrates beteiligt sind, ist die Helix αB (23-34) besonders zu erwähnen. Weiterhin spielen die Strukturen βA, βC, βE, βF sowie αC noch eine Rolle. Der Nicotinamidring (in Abb. 7 nicht eingezeichnet) würde über den Pteridinring zu liegen kommen und so das aktive Zentrum nach vorne begrenzen. Der Nicotinamidring wechselwirkt mit den Strukturen βA, βE, αC und den Aminosäuren 13, 19.[49]

A5 Die Katalyse

Wenn man an Hand des DHFR-NADPH-MTX-Komplexes die Reduktion der Dihydrofolsäure simuliert, unter der Voraussetzung, daß der Pteridinring ebenso gebunden ist wie für MTX in der Kristallstruktur vorgegeben, so erhält man nach der Reduktion ein Produkt mit der absoluten Konfiguration R an C6. Dreht man den Pteridinring um einen Betrag von 180 Grad um die Achse C6-C9 so hat das reduzierte Produkt am Kohlenstoff 6 die absolute Konfiguration S (Abb. 1).
Röntgenstrukturuntersuchungen von Fontecilla-Camps et.al. an N5,N10-Methylidintetrahydrofolat, das vom biologisch aktiven Diastereomer von N5,N10-Methylentetrahydrofolat erhalten worden war, ergaben für das C6-Atom als absolute Konfiguration S.[55,56]
Charlton et.al. untersuchten die absolute Stereochemie der Reduktion von Folsäure zu Dihydrofolsäure. Sie konnten zeigen, daß sowohl die Reduktion an C6 als auch an C7 einen Hydridtransfer des 4-pro-R-Wasserstoff von NADPH zur C7 si-Seite der Folsäure beinhaltet.[57]
Daraus folgt, sowohl Folsäure als auch Dihydrofolsäure müssen im aktiven Zentrum in einer Konformation binden, in der der Pteridinring gegenüber MTX um 180 Grad gedreht ist. Theoretische Untersuchen von Spark et.al. weisen für diese Orientierungen der Pteridinringe von MTX und DHF günstige Wechselwirkungen mit den aktiven Zentren nach.[58]
Filman et.al. entwickelten ein Modell des Reduktionsmechanismus an Hand der Kristallstruktur des L.c. DHFR-NADPH-MTX-Komplexes und Beobachtungen an anderen Dehydrogenasen.[34]
In diesem Modell erfolgt die Übertragung der zur Reduktion benötigten Wasserstoffe einmal über Hydrid-Transfer vom Nicotinamidring zu C6 und zum anderen durch Übertragung eines Protons auf N5 (Abb. 9). Es wird vermutet, daß das

Proton über eine Wasserbrücke, gebildet aus zwei Wassermolekülen, die auch in der Röntgenstruktur nachgewiesen sind, und die mit dem Lösungsmittelwasser in Verbindung steht, ins aktive Zentrum transportiert wird.
Interessant bei diesem Modell ist, daß eine Stabilisierung des Nicotinamidringes im Übergangszustand auftreten würde, wie sie aus Beobachtungen von Cook et.al. an der Alkohol-Dehydrogenase gefordert wird.[59] Cook et.al. nehmen aufgrund von sekundären Isotopen-Effekten, beobachtet an N1 mit ^{15}N markiertem NAD^+ an, daß der nach dem Verlassen eines Hydrid-Ions positiv geladene Ring teilweise Carbonium-Ion Charakter an den Positionen C2, C4 und C6 besitzt (Abb. 8/B). Sie finden für den Übergangszustand an N1 eine geringere Bindungsordnung als sowohl im NAD^+ und im NADH. In NAD^+ (Abb. 8/D) ist die Bindungsordnung 4 in NADH (Abb. 8/A) größer als 3 aufgrund der Wechselwirkung des p-Orbitals von N1 mit den πElektronen der Doppelbindungen. (Im Übergangszustand wäre die Bindungsordnung des N1 bei einer Pyramidalisierung genau 3)

Man kann für die Beobachtungen zwei Strukturen anbieten, die als Erklärung dienen können.

- Der Ring nimmt im Übergangszustand Bootform an, mit einer Begünstigung der positiven Ladung am C 4.
  (Abb. 8/C)
- Der Ring bleibt planar, neigt sich gegenüber C1 der Ribose, indem der Stickstoff pyramidalisiert (Bindungsordnung = 3) und die positive Ladung wird auf die Atome C2, C4, C6 delokalisiert (Abb. 8/B).

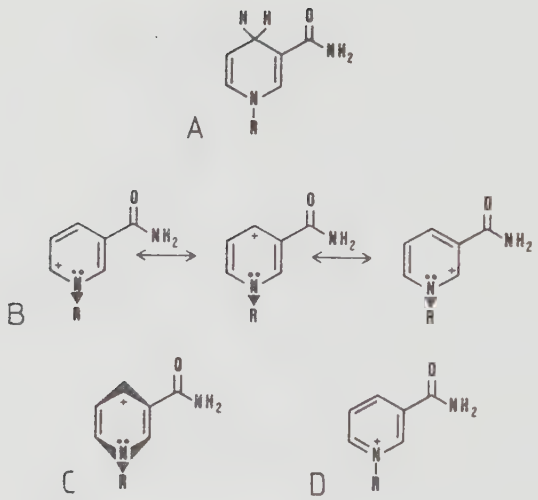


Abb. 8 Einige Isomere von N1-substituierten Nicotinamid-Verbindungen

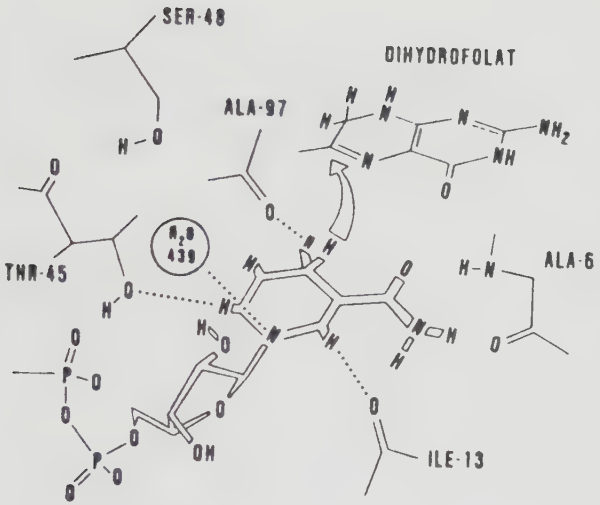


Abb. 9 Schematische Darstellung des angenommenen DHFR-NADPH-DHF-Komplexes. Die polaren Wechselwirkungen zwischen Sauerstoffatomen und den Atomen C2,C4,C6 des Nicotinamidringes sind hervorgehoben. (D.J. Filman, J.T. Bolin, D.A. Matthews, J. Kraut, J. Biol. Chem. 257, 13670 (1982)

Filman et.al. betrachten die zweite Möglichkeit aufgrund der Geometrie in der Umgebung des Nicotinamidringes als begünstigt.[34]

Die Stabilisierung des Carbonium-Ion-Charakters an C2,C4,C6 kann durch die Sauerstoffe O:13, O:97, Oγ:45 erfolgen, die nach Pyramidalisierung des Stickstoff mit dem Ring in einer Ebene liegen (Abb. 9). Wenn keine direkte Stabilisierung über Wasserstoffbrücken möglich ist, so doch wenigstens

über polare Wechselwirkungen. Die Idee, daß Sauerstoffunktionen, geeignet um den Nicotinamidring positioniert, die Reaktionsrate erhöhen, wird durch Beobachtungen von Sigman et.al. unterstützt.[60]
Ein weiteres strukturelles Muster, welches den obengenannten Übergangszustand begünstigt, ist die energiereiche Konformation der Säureamidgruppe. Ab-Initio-Berechnungen sowie kristallographische Untersuchungen ergaben als günstigste Konformation des Säureamidstickstoffes (N7) zu C2 eine anti-Stellung.[61,62] Im Gegensatz dazu ist die Säureamidgruppe in der DHFR-NADPH-MTX-Kristallstruktur um 180 Grad gedreht und steht somit in syn-Stellung zu C2. Dieser energiereiche Zustand kann aufgehoben werden, indem sich C2 relativ zur Säureamidfunktion bewegt, was einmal geschehen kann, indem der Ring Bootform annimmt, aber auch indem N1 pyramidal wird (Abb. 9).
Ein drittes Charakteristikum der Bindungsstelle des Nicotinamidringes begünstigt die Pyramidalisierung von N1 im Überganszustand. Wasser 439 in der Kristallstruktur ist befähigt mit dem einsamen Elektronenpaar des N1 nach Pyramidalisierung in Wechselwirkung zu treten und eine Wasserstoffbrücke auszubilden (Abb. 9).[34]

Es ist zur Zeit aufgrund von röntgenographischen Untersuchungen noch unklar, ob in anderen NAD^+-abhängigen Dehydrogenasen ein ähnliches strukturelles Muster vorhanden ist, das den oben vorgestellten Übergangszustand stabilisiert.[34]

B PROBLEMSTELLUNG

B1 Thema der Arbeit

Anfang der sechziger Jahre begann man aus Vergleichen zwischen chemischer Struktur verschiedener Derivate von Arzneimitteln und deren biologischer Wirksamkeit rein qualitativ Topographien der entsprechenden Bindungsstellen abzuleiten.[63-65]

Aufbauend auf diesen Ideen und darauf, daß zur Charakterisierung einer solchen Bindungsstelle nur wenige Aminosäuren notwendig sind, wurde zur Überprüfung ebenso wie zum theoretischen Aufbau einer solchen geometrischen Struktur ein neues Verfahren entwickelt.[66] Bei der Annäherung an die Bindungsstelle (simuliert mit einer oder zwei Aminosäuren) soll sich das Arzneimittelmolekül so ausrichten, daß es zu einer effektiven Wechselwirkung kommt und ein Komplex mit der Bindungsstelle eingegangen wird. Der bei der Pharmakon-Rezeptor-Wechselwirkung freiwerdende Energiebetrag soll mit der experimentell ermittelten pharmakologischen Wirksamkeit der Verbindung korrelierbar sein. Dabei ergeben sich signifikante Korrelationen nicht mit beliebigen, sondern nur mit jeweils bestimmten Aminosäuren. Für eine Reihe von verschiedenen Arzneimittelklassen hat Höltje solche Rezeptorbindungsstellen postuliert.[67-71] Für die meisten Modelle sprach bisher allein eine statistische Absicherung. 1982 ist es Höltje et.al. gelungen, für calciumantagonistisch wirkende Verapamil-Derivate eine Bindungsstelle zu postulieren, nämlich Arginin, bei deren Blockade im pharmakologischen Test sich tatsächlich die Wirkung der Verapamil-Analoga signifikant verringerte.[71,72]

Selbst wenn dies keine eindeutige Absicherung für das errechnete Rezeptormodell ist, so deutet der experimentelle Befund doch darauf hin, daß die Aminosäure Arginin innerhalb der Bindungsregion auftaucht und eine Rolle spielt.

Tintelnot und Höltje fanden eine ähnliche Absicherung ihres Modells für die Chloramphenicol-Bindungsstelle.[73]

Simon untersuchte, ob die Rechenverfahren, die zur Berechnung der Wechselwirkungsenergien und damit zur Aufstellung der Rezeptormodelle angewandt worden waren,[66-71] in der Lage sind, das inhibitorische Verhalten von Substanzen anhand eines realen Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungskomplexes zu beschreiben.

Die Geometrie des aktiven Zentrums wurde bei Simon durch die Röntgenstruktur der Humanerythrocytencarboanhydrase C gegeben. Als Liganden dienten Sulfonamid-Inhibitoren, deren pI_{50}-Werte experimentell ermittelt worden waren. Dabei stellt der pI_{50}-Wert den negativ dekadischen Logarithmus derjenigen Inhibitorkonzentration dar, die die Enzymaktivität um 50 % hemmt.
Simon konnte in seiner Untersuchung zeigen, daß die errechnete Wechselwirkungsenergie der Liganden mit dem aktiven Zentrum, die als Maß für die Stabilität des EI-Komplexes interpretiert werden kann, mit den experimentell ermittelten Inhibitorraten signifikant korrelierte. Somit waren in diesem Fall die verwendeten Rechenverfahren in der Lage, zutreffend einen realen Enzym-Inhibitor-Komplex rechentechnisch zu simulieren.[74]

Thema dieser Arbeit ist die Untersuchung des Zusammenhangs der Wechselwirkungsenergien zwischen dem aktiven Zentrum einer DHFR und experimentell ermittelten pI_{50}-Werten von DHFR-Inhibitoren. Das aktive Zentrum soll ebenso wie bei Simon durch eine röntgenographisch untersuchte Kristallstruktur gegeben werden.
Da bei der Reduktion von DHF durch DHFR NADPH als Coenzym fungiert und außerdem bekannt ist, daß das Bindungsverhalten von Inhibitoren durch NADPH beeinflußt wird, müssen

folgende Bedingungen bei der obigen Fragestellung erfüllt sein:[75-77]

- die zu verwendende Kristallstruktur soll NADPH enthalten.
- bei den eingesetzten Inhibitorraten muß sichergestellt sein, daß das Enzym während des ganzen Versuchs mit NADPH abgesättigt war, damit die erhaltenen Werte einen DHFR-NADPH-Inhibitor-Komplex und keinen EI-Komplex wiedergeben.
- die Hemmraten sollen am gleichen Enzym bestimmt worden sein, von dem auch die Kristallstruktur stammt.

Die einzige röntgenographisch untersuchte Kristallstruktur, die zu Beginn dieser Arbeit auch das Coenzym enthielt, war die des DHFR-NADPH-MTX-Komplexes von Lactobacillus casei.[21]

Wegen der durch die Struktur bekannten Geometrie des Inhibitors MTX im aktiven Zentrum, sollen auch strukturanaloge MTX-Derivate als Inhibitoren untersucht werden.

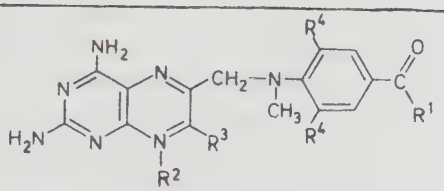
Chaykovksy et.al. und Rosowsky et.al. veröffentlichten Inhibitorraten von MTX-Analoga, die die obigen Anforderungen erfüllen (Abb. 10).[78,79]

In diesen Versuchen ist selbst bei vollständiger Reduktion der Dihydrofolsäure noch ein 450-facher Überschuß an NADPH gegenüber DHFR vorhanden, welcher bei einer Dissoziationskonstanten von 10^{-8} sicherlich zur Absättigung ausreicht.[78,79,80]

Für das weitere Arbeiten mit der Kristallstruktur sowie für die Berechnung der Wechselwirkungsenergie zwischen den Liganden und dem aktiven Zentrum sowie deren Korrelation

mit experimentell bestimmten Inhibitorraten sind folgende Annahmen wesentlich:

- Die Kristallstruktur des NADPH-DHFR-MTX-Komplexes ist nicht sehr verschieden von der Struktur in Lösung. Diese Annahme scheint zu gelten wegen der Ähnlichkeit von Kristalldaten und Beobachtungen spektroskopischer Art in Lösung.[21,81]
- Die Enzymkonformation ändert sich nicht, wenn Substanzen mit ähnlicher Struktur binden. Diese Annahme scheint sich ebenfalls nach röntgenographischen Untersuchungen an der DHFR aus Hühnerleber zu bestätigen.[25]
- Jede analoge Substanz bindet ähnlich der Muttersubstanz.



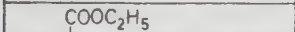
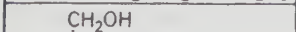
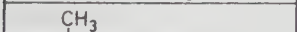
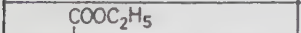
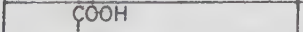
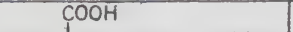
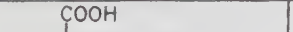
R^1	R^2	R^3	R^4	Kennzeichnung	pI_{50}
	—	—	—	MTX	8.52
	—	—	—	6a	6.15
	—	—	—	6b	6.00
	—	—	—	6c	6.52
	—	—	—	6d	6.69
OH	—	—	—	6e	6.52
OC_2H_5	—	—	—	6f	6.15
	0	—	—	7a	4.69
	0	—	—	7d	4.52
	—	—	Cl	DCMTX	8.52
	—	CH_3	—	7-MeMTX	5.0
	—	CH_3	Cl	7-MeDCMTX	5.05

Abb. 10 DHFR-Inhibitoren und ihre pI_{50}-Werte

Es soll so vorgegangen werden, daß zuerst die Bindungsstellen für die Inhibitoren im aktiven Zentrum von den 162 Aminosäuren ausgewählt werden. Dabei sollen alle Aminosäuren berücksichtigt werden, die an der Bildung der 15Å tiefen Höhlung beteiligt sind. Anschließend erfolgt die Substitution der Wasserstoffe, da durch die Röntgenstruktur nur die Koordinaten der Nichtwasserstoffe geliefert werden.

Weil eine Gesamtdarstellung des aktiven Zentrums aufgrund der begrenzten Rechenkapazität der einzelnen Programme nicht möglich ist, wird die Berechnung der Wechselwirkungsenergie zwischen den Inhibitoren und dem aktiven Zentrum aufgeteilt. Sie wird jeweils errechnet zwischen dem einzelnen Inhibitor und einzelnen oder zu einer Bindungsstelle zusammengefaßten Aminosäuren.
Mit Hilfe des semiempirischen quantenchemischen Programmes IEHT und des daraus weiterentwickelten Programmes MOMENT soll die relative Ladungsverteilung in Form von Dipolen, Quadrupolen und Oktupolen errechnet werden. Zur Berechnung der Wechselwirkungsenergie soll das von Rein et.al. entwickelte Rechenverfahren INTOC eingesetzt werden. Die Gesamtwechselwirkungsenergie setzt sich zusammen aus einem elektrostatischen, Polarisations-, Dispersions- und einem Repulsionsterm. Diese Verfahren wurden von Simon mit Erfolg eingesetzt.[74]
Die Gesamtwechselwirkungsenergie der einzelnen Inhibitormoleküle zum Enzymmodell wird zuletzt mit den experimentell ermittelten Inhibitorraten korreliert.
Ziel der Arbeit ist eine weitere Bestätigung für die Annahme, daß theoretische Rechenverfahren für die Simulation solcher komplizierter WW-Komplexe geeignet sind.

B2 Allgemeine Bemerkungen

Als diese Arbeit im Jahre 1981 begonnen wurde, war vom L.c. DHFR-NADPH-MTX-Komplex eine Röntgestruktur verfügbar mit einer Auflösung von 2.5 Å und einem kristallographischen r-Faktor von 0.49. Mit dieser Struktur, geliefert von der Protein Data Bank, wurden Betrachtungen über den Aufbau des aktiven Zentrums durchgeführt.[82]

Sehr bald stellte sich aber heraus, daß innerhalb der Struktur zwischen nicht miteinander verbundenen Atomen unrealistisch kurze Abstände auftauchten. Es wurden Abstände zwischen Stickstoff und Sauerstoff von 1.8Å, zwischen Stickstoff und Kohlenstoff von 2.5Å gefunden. Solche Abstände können sinnvollerweise nicht zur Berechnung von Wechselwirkungsenergien eingesetzt werden.
Nach Rücksprache mit einem der Mitautoren, David A. Matthews, konnte ab Februar 1982 mit einer verfeinerten, optimierten Struktur des gleichen Komplexes, die innerhalb einer persönlichen Mitteilung übermittelt wurde, weitergearbeitet werden. Publiziert wurde diese neue Struktur im November 1982.[49]
Wenn im folgenden von alter Struktur oder Geometrie gesprochen wird, soll die alte unverfeinerte Struktur gemeint sein, unter der Bezeichnung neue Struktur, soll die optimierte, korrigierte Struktur verstanden werden.

C DURCHGEFÜHRTE ARBEITEN

C1 Darstellung des aktiven Zentrums

In der Veröffentlichung zur alten Struktur des Dreierkomplexes DHFR-NADPH-MTX waren einige Bindungsstellen für MTX angegeben worden.[21] Diese Bindungsstellen gelten auch noch für die neue korrigierte Struktur.[49]
Um ein umfangreiches Bild von der Geometrie des aktiven Zentrums zu erhalten, wurden mit Hilfe des ORTEP-Programmes vom Inhibitor MTX aus Abstandsmessungen zu allen 162 Aminosäuren des Enzyms durchgeführt und diejenigen ermittelt, die in einem Radius von 6Å um den Inhibitor liegen.[83] Die räumliche Anordnung dieser Aminosäuren wurde mit Hilfe von Stereo-Zeichnungen überprüft, die mit dem Programm ORTEP angefertigt wurden. Nun erfolgte eine optische Auswahl der Bindungsstellen-Aminosäuren je nachdem, ob sich der Rest der Aminosäuren vom Inhibitor weg oder zu ihm hin orientiert. Ausgeschlossen wurden solche Aminosäuren, die nur mit einem oder zwei Atomen innerhalb des 6Å-Radius um den Inhibitor liegen.
Letztlich wurden zusätzlich zu den in der Literatur angegebenen Aminosäuren nur noch 5 weitere zum Aufbau des aktiven Zentrums hinzugezogen:

Prolin 24
Tyrosin 29
Threonin 45
Prolin 50
Prolin 55

Alle 20 Bindungsstellen des aktiven Zentrums mit den entsprechenden Teilstrukturen von Methotrexat, mit denen sie wechselwirken, sind in Tab. 3 aufgeführt (Abb. 11).

Simon ging in seiner Arbeit von einer umfassenderen Darstellung des aktiven Zentrum aus (Radius von 12Å um den Inhibitor).[74] Aufgrund seiner Beobachtung, daß 11 von 30 Aminosäuren, die die Bindungsstelle der Sulfonamide simulieren, 80-95 % der Gesamtwechselwirkungsenergie liefern, kann kein gravierender Einfluß bei der Erweiterung des hiesigen Modells über 20 Bindungsstellen hinaus auf die Gesamtwechselwirkungsenergie erwartet werden.

Teil von MTX	Bindungsstelle in L.c. DHFR
2,4-Diamino-6-methylpteridin	
	Leucin 4
	Peptid 5,6
	Leucin 19
	Asparaginsäure 26
	Leucin 27
	Tyrosin 29
	Phenylalanin 30
	Peptid 97,98
	Threonin 116
	Nicotinamid
p-Aminobenzoesäureamid	
	Leucin 27
	Phenylalalin 30
	Threonin 45
	Serin 48
	Phenylalalin 49
	Prolin 50
	Leucin 54
L-Glutaminsäure	
	Prolin 24
	Leucin 27
	Histidin 28
	Phenylalanin 30
	Arginin 31
	Leucin 54
	Prolin 55
	Arginin 57

Tab. 3 Teilstrukturen von MTX und die Bindungsstellen, mit denen sie wechselwirken

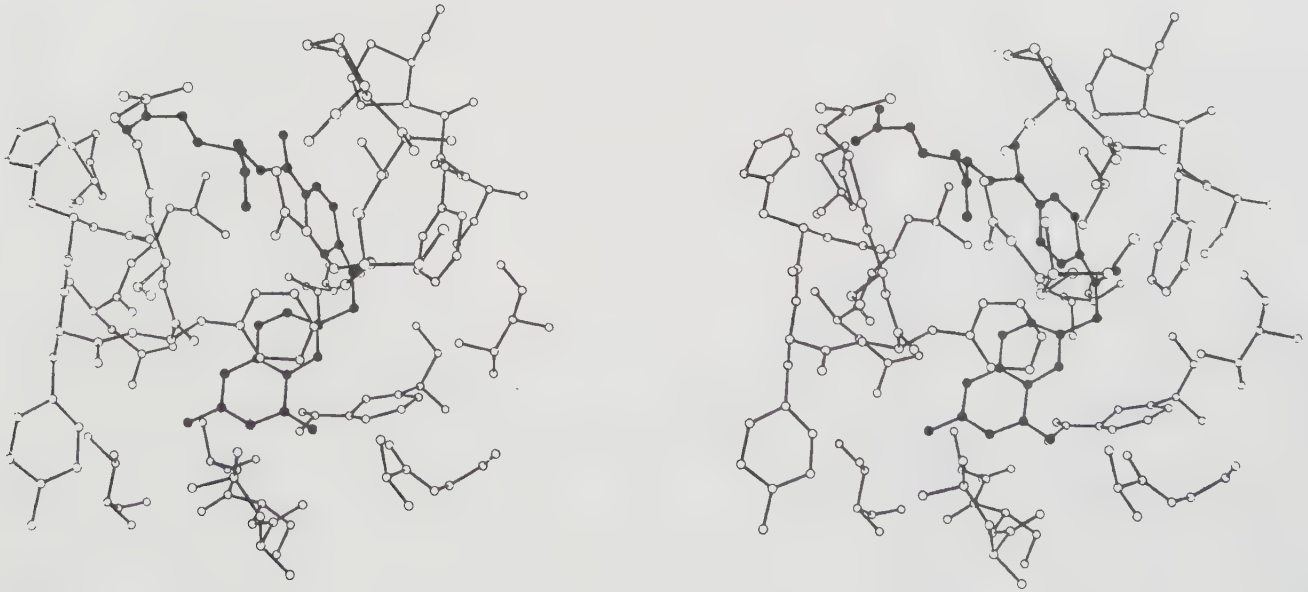
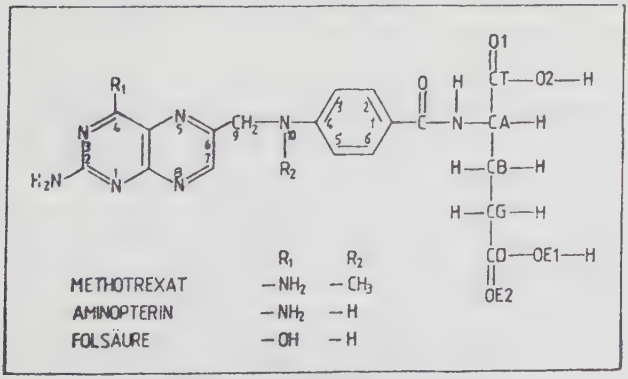


Abb. 11 Die 20 Bindungsstellen des aktiven Zentrums zusammen mit MTX, (MTX schwarz) Stereozeichnung

Auch zu den Sauerstoffatomen der Wassermoleküle, die in der Struktur enthalten sind, wurden Abstandsmessungen durchgeführt und diejenigen ermittelt, die in einem Abstand von 6Å um den Inhibitor eingelagert sind.
Im erwähnten Radius befinden sich nur 16 Wassermoleküle. Die meisten Wassermoleküle sind im Bereich des L-Glutaminsäureanteiles von MTX positioniert (d.h. an der Oberfläche des Dreierkomplexes (Abb. 7, Abb. 12, Tab. 4)). Im aktiven Zentrum selbst ist nahezu kein Wasser vorhanden. Wasserstoffbrücken zu Strukturen des Inhibitors vermögen nur die Moleküle 331, 443 und 621 aufzubauen.

Tab. 4 Die 16 Wassermoleküle und ihre Entfernung von MTX-Strukturen in Å

Kennzeichnung	Position in der Kristallstruktur
201	Thr 116, 2-Aminofunktion
209	p-Aminobenzoesäure : 5
215	p-Aminobenzoesäure : 5
217	N8 : 5
253	N8 : 3.3
256	p-Aminobenzoesäure : 5
257	p-Aminobenzoesäure : 5
258	CD : 5.9
322	CA,CB,CT : 4.7
329	OE2 : 3.5
331	O2 : 2.7
351	OE2 : 5.8
402	N : 5.9
443	OE2 : 3.2
606	CD,CG : 5
621	OE1 : 2.5



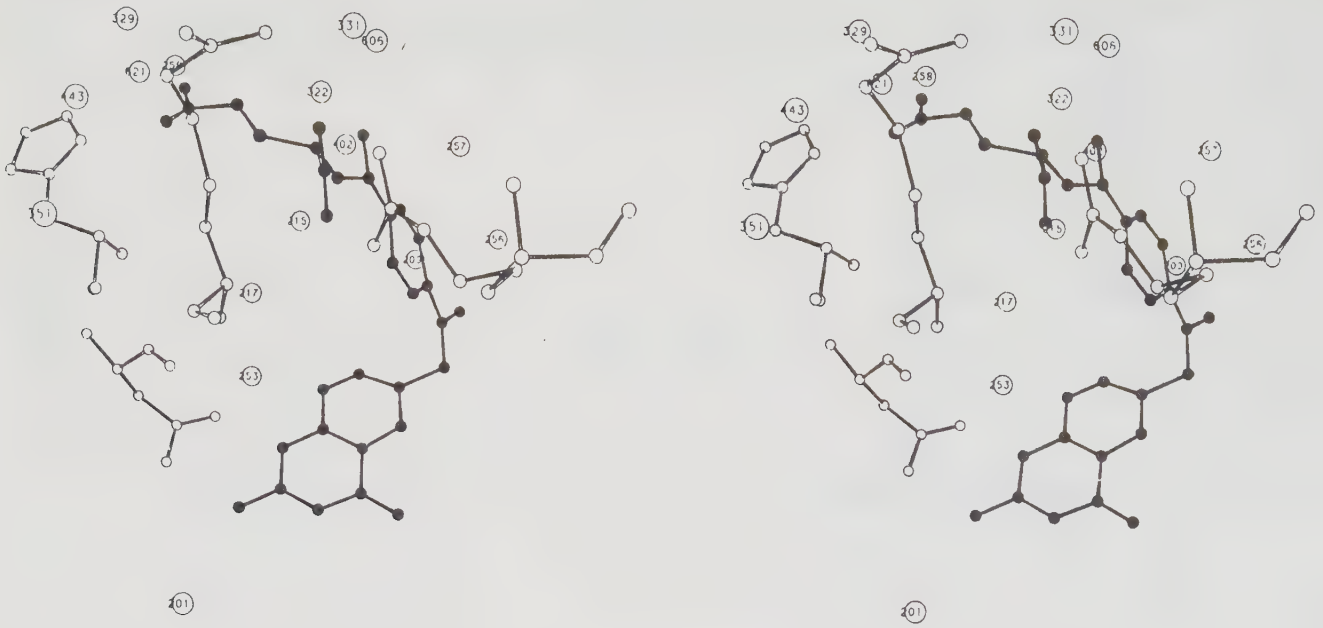


Abb.12 Asp 26, His 28, Arg 31, Arg 57, die 16 Wassermoleküle im Abstand kleiner 6Å um MTX, (MTX schwarz) Stereozeichnung.

C2 Die Atomkoordinaten der Aminosäuren und Inhibitormoleküle

C.2.1 Geometrieüberprüfung und ihr Einfluß auf die Ladungsverteilung

Bindungslängen und Bindungswinkel bei Röntgenstrukturen solchen Ausmaßes wie die von Enzymen besitzen häufiger Werte, die vom Standard mehr oder weniger stark abweichen. Die Ursache liegt darin begründet, daß zur Interpretation der erhaltenen Reflexe innerhalb der Verfahren zur Auswertung größere Toleranzen von Standardwerten zugelassen werden. Bei rigidem Festhalten an Standardwerten ist eine Auswertung oft nicht möglich. Diese Tatsache führt aber nicht zu einer schlechten Qualität der Struktur, wie ein r-Faktor von 0.15 bestätigt.

Um zu überprüfen, wie groß solche Abweichungen innerhalb der verwendeten Struktur sind, wurden von allen beteiligten Bindungsstellen sowie MTX mit Hilfe des BUILD-Programmes die Bindungslängen, Bindungswinkel und dihedrischen Winkel bestimmt.[84] Es wurden Abweichungen von Standardwerten festgestellt, die normalerweise innerhalb einer Abweichung von 10 % liegen. Als Beispiel der Untersuchung soll die Kette Ser 48, Phe 49, Pro 50 vorgestellt werden (Abb. 13). Die dihedrischen Winkel sind nicht eingetragen.
Auffallend ist das Auftreten großer Abweichungen von Standardwerten bei Pro 50 (C-N = 1.73Å, C-N-C = 155.28 Grad) (vgl. Abb. 13). Die gleiche Beobachtung wurde bei Pro 24 und Pro 55 gemacht. Für diese extremen Abweichungen sollte nun die Frage untersucht werden, in wieweit die Berechnung der Ladungsverteilung solcher Strukturen noch realistisch ist.
Zu diesem Zweck wurde einmal die Ladungsverteilung für die Geometrie der Prolinmoleküle berechnet, wie sie durch die

Röntgenstruktur vorgegeben war, und zum anderen für die gleichen Moleküle, nachdem eine Angleichung der Bindungslängen und Winkel erfolgt war, wie sie von Bats et.al. publiziert worden sind.[85] Zur Berechnung der Ladungsverteilung wurde das IEHT-Programm herangezogen.[86,87]
Bei der Betrachtung der Ladungsverteilung der korrigierten und der unkorrigierten Form ist, trotz erheblicher Differenzen in der Ausgangsgeometrie, keine große Abweichung festzustellen (Abb. 13, Abb. 14, Tab. 5).

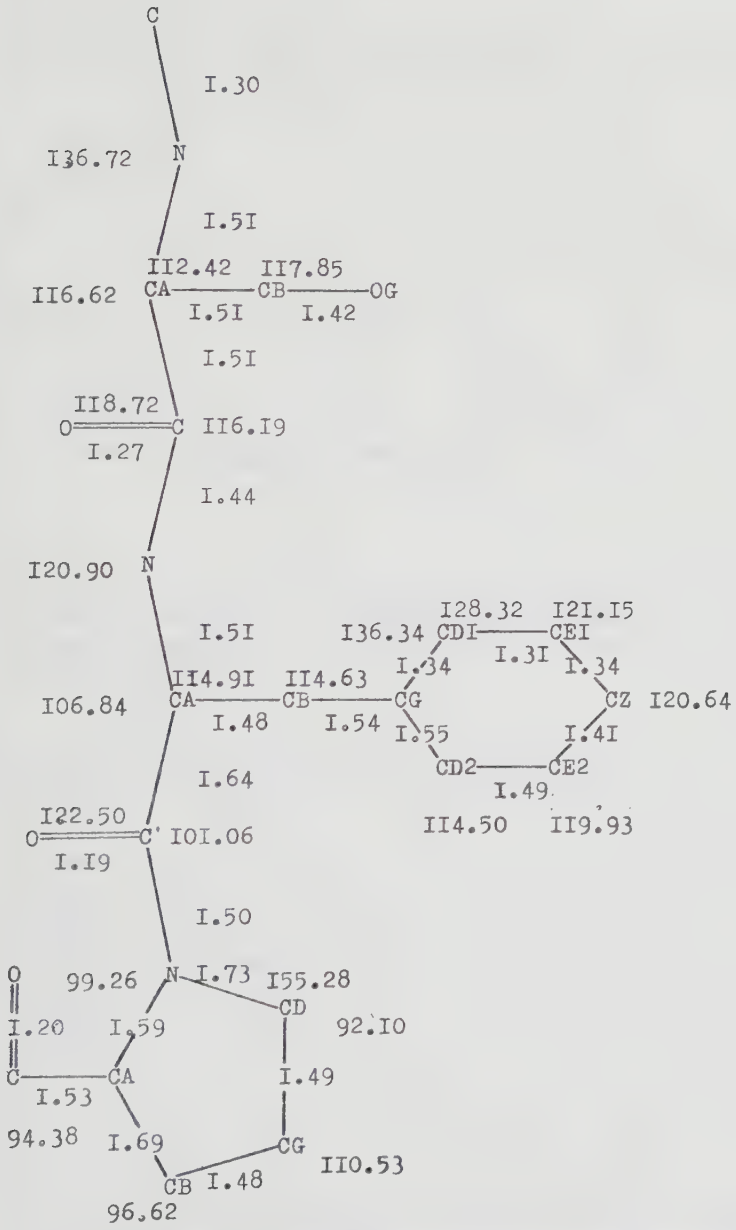
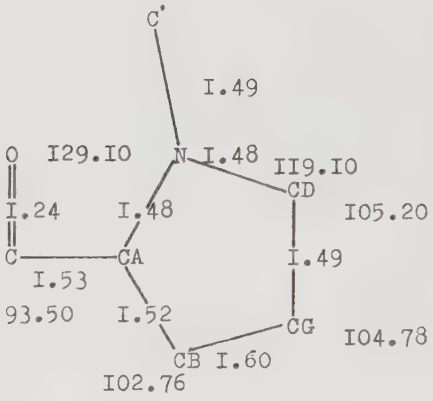


Abb. 13 Bindungslängen und Bindungswinkel der Kette Ser 48, Phe 49 und Pro 50

Abb. 14 Bindungslängen und Bindungswinkel der korrigierten Geometrie von Pro 50.



Tab. 5 Ladungsverteilung der Nichtwasserstoffe im korrigierten und unkorrigierten Prolinmolekül.

Atom	rel.Ladungsverteilung: unkorr.	korr
C'	0.074	0.038
N	-.I9I	-.I7I
CA	0.06I	0.077
CB	0.045	0.05I
CG	0.042	0.029
CD	0.02I	0.047
C	0.08I	0.08I
O	-.273	-.28I

Diese Ähnlichkeit der Ladungsverteilung von unkorrigierter und korrigierter Struktur wurde auch als Ergebnis für Pro 24 und Pro 50 erhalten.
Das Resultat zeigt, daß die Abweichungen der Bindungswinkel und Abstände von der Norm, bei einem Einfluß auf die Ladungsverteilung von maximal 5 hundertstel Elektron, vernachlässigbar sind. Daher ist es möglich die Röntgenstruktur unverändert zur Berechnung von Wechselwirkungsenergien heranzuziehen.

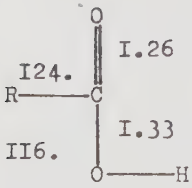
In der Veröffentlichung der Struktur, die einige Monate später erfolgte, wurde von den Autoren eine mittlere Abweichung der Bindungslängen vom Standard für das gesamte Molekül von 0.065Å angegeben.[49]

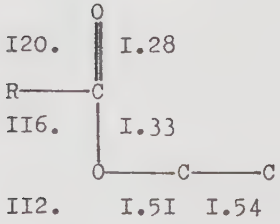
Die Ergebnisse decken sich mit denen von Simon, der für Wasserstoffe bei Winkelveränderungen bis zu 20 % sowie Bindungslängenveränderungen bis zu 10 % maximal 5 hundertstel Elektron Differenz in der Ladungsverteilung gefunden hat.[74]

Tab. 6 Standardbindungslängen und -winkel

Bindung	(Å)
C——H	I.09
N——H	I.03
O——H	0.96
O——H(Carboxyl)	0.9I
C——C	I.54
C_{ar}——C	I.5I
N——→O	I.28
C——Cl	I.70
C——O	I.45

Bindungswinkel	(Grad)
$C_{sp}3$	I09.
$C_{sp}2$	I20.
$N_{sp}3$	I07.
$N_{sp}2$	I20.
C——O——H	I05.





C2.2 Die Positionierung der Wasserstoffe

In der Röntgenstruktur der DHFR sind nur die Koordinaten der Nichtwasserstoffatome angegeben. Die Koordinaten der Wasseratome mußten also noch bestimmt werden. Zur Errechnung der Wasserstoffkoordinaten wurde das Substitutionsprogramm X-RAYATS eingesetzt.[88]
Zur Berechnung neuer Koordinaten benötigt das Programm folgende Angaben:

- die Koordinaten des Atoms, zu dem der Wasserstoff die Bindung eingeht, sowie die Koordinaten der Nachbaratome.
- die Angabe der Bindungslänge, des Bindungswinkels und des dihedrischen Winkels.

Zur Errechnung von Atomkoordinaten, denen tetraedrische bzw. trigonale Winkel zu Grunde liegen, kann innerhalb dieses Programmes mit spezifischen Parametern gearbeitet werden, ohne genaue Eingabe des Bindungswinkels und des dihedrischen Winkels.
Die eingesetzten Bindungslängen und Bindungswinkel sind in Tabelle 6 aufgelistet.[89,90]
Die Geometrie aller errechneten Wasserstoffkoordinaten wurde mit Hilfe von Stereo-Zeichnungen überprüft.

C2.3 Der Aufbau der Inhibitorkoordinaten

Für MTX sind die Nichtwasserstoffkoordinaten durch die Röntgenstruktur vorgeben, und sie wurden keinerlei Veränderung unterzogen. Die Koordinaten der Wasserstoffe wurden mit dem oben beschriebenen Programm X-RAYATS errechnet.

Für den Aufbau der anderen Inhibitoren gilt die Annahme, daß die Teile der Struktur, die für alle Liganden identisch sind, die gleiche Geometrie behalten sollen, wie sie für MTX durch die Kristallstruktur vorgegeben ist.
Die Koordinaten der Reste R2(O), R3($-CH_3$) sowie R4(Cl) wurden wie die Wasserstoffkoordinaten mit dem X-RAYATS-Programm bestimmt (Abb. 10).

Als Rechenverfahren zur Erzeugung der R1-Substituenten wurde das Programm COORD angewandt.[91] Da die Berechnung der Atomkoordinaten der Reste in einem neuen orthogonalen Koordinatensystem erfolgt, was sich nicht mit dem durch die Röntgenstruktur gelieferten orthogonalen System deckt, müssen 4 Bezugspunkte im neuen Koordinatensystem vorhanden sein, die sich auch in der Röntgenstruktur finden lassen. Mit Hilfe dieser Bezugspunkte kann später eine Koordinatentransformation der R1-Substituenten durchgeführt werden. Als Bezugspunkte dienten die Atome C3', C2', C1', C (Abb. 1, Abb. 11). Ihre räumliche Anordnung war zuvor mit dem BUILD-Programm ermittelt worden.[84]

C3' wird nun beim Aufbau der R1-Atomkoordinaten in den Ursprung des neuen kartesischen Koordinatensystems gelegt. C2' wird im ermittelten Bindungslängenabstand auf die positive X-Achse positioniert. C1' wird in der X-Y-Ebene erzeugt, C je nachdem, wie der dihedrische Winkelanteil ist, ebenfalls in die Ebene hinein, oder durch Erhalt einer Z-Komponente aus der Ebene heraus.

Aufbauend auf diesen vier Atomen wurden durch Angabe der Bindungslängen und Winkelanteile die kartesischen Koordinaten aller R1-Substituenten erzeugt. Es wurden Standardlängen und -winkel benutzt (Tab. 6)[89,90]

Der Aufbau der R1-Reste erfolgte soweit als möglich in der gleichen Geometrie wie sie für den L-Glutaminsäureanteil von MTX durch die Röntgenstruktur vorgezeichnet ist (d.h. die zu den Atomen CA, CT, CB, CG, CD, analogen Atome von R1 wurden in gleicher Geometrie zueinander erzeugt (Abb. 1, Abb. 11)).

Wie schon erwähnt, sind die beiden Koordinatensysteme der Röntgenstruktur und der R1-Substituenten nicht identisch. Es müssen die Reste R1 des neuen orthogonalen Systems auf das ursprüngliche der Kristallstruktur übertragen werden. Dies geschieht mit Hilfe einer Transformationsmatrix an Hand der vier in ihrer Geometrie identischen Atome C3', C2', C1', C. Mit dieser Matrix, die aus einem Gleichungssystem von 12 Gleichungen mit 12 Unbekannten hervorgegangen ist, können alle Koordinaten der R1-Substituenten in die Koordinaten der Röntgenstruktur transformiert werden. Simon hat in seiner Arbeit das Verfahren näher beschrieben.[74]

C2.4 Der Einbau der Inhibitoren in das aktive Zentrum

Nachdem die Geometrien aller Inhibitoren erzeugt und in das aktive Zentrum der DHFR eingebaut worden waren, mußte überprüft werden, ob die Abstände zwischen nichtbindenden Atomen der MTX-Analoga und den 20 Bindungsstellen den geforderten Werten entsprechen. Als Kriterien für die Mindestabstände dienten dabei Angaben von Dickerson und Geis,[53] sowie Heilbronner und Bock.[92] Zu kurze Abstände sollten zuerst über Drehungen der Reste der Inhibitoren be-

hoben werden. Erst wenn ein einwandfreier Einbau der MTX-Analoga auf diese Weise alleine nicht möglich sein sollte, sollten Veränderungen an den Bindungsstellen vorgenommen werden.

Der Einbau erfolgte iterativ. Über Abstandsmessungen von Atomen der Liganden zu denen der Bindungsstellen, sowie über Betrachtung von Stereo-Zeichungen, die den Inhibitor im aktiven Zentrum darstellen, konnten kritische Bereiche leicht erkannt werden.

Korrekturen erfolgten, indem ganze Reste oder Atomgruppen mit Hilfe des WALKUR-Programmes gedreht wurden.[93] An Änderungen der Geometrie schlossen sich immer wieder Abstandsmessungen an, denen wiederum die Auswertung der Stereo-Zeichnungen folgte. Nach mehreren aufeinanderfolgenden Korrekturen gelang es, alle R1-substituierten Verbindungen ohne Überlappung von Atomen und ohne Änderung der Geometrie einer einzigen Bindungsstelle in das aktive Zentrum einzubauen. Auch der Einbau der N-Oxid-Verbindungen in das aktive Zentrum war unproblematisch.

Für die Verbindungen, die als R3, R4 andere Substituenten als Wasserstoffe trugen, war eine Fixierung im aktiven Zentrum unter Beibehaltung der MTX-Geometrie ohne Drehung an Achsen der Bindungsstellen nicht möglich (Abb.10 ,Abb.11).

So ergab sich für den Abstand des 7-Methylkohlenstoff von 7-MeDCMTX zum CD-Kohlenstoffatom von Leu 19 ein Wert von 2.5Å (gef. 3.0-3.2Å) und für die Chloratome zum Phenylring von Phe 49 ein Wert von 2.9Å (gef. 3.3-3.5Å).
Behoben werden konnten diese Probleme nur, indem für die 7-Methylderivate Leu 19 und Leu 27 jeweils um die C $-C_{\beta}$ Achse um die Beträge von 70 bzw. 120 Grad gedreht wurden.

Für die beiden Dichlormethotrexat-Derivate erfolgte für Phe 49 eine Drehung der gleichen Achse um den Betrag von 20 Grad. Phe 30 mußte einer Drehung von 15 Grad um die C-C_α Achse unterzogen werden, damit tolerable Abstände zwischen Kohlenstoff und Chlor gemessen werden konnten.

C3 Wasserstoffbrückensysteme und Ladungen innerhalb von Proteinkomplexen

Bei der Betrachtung der Bindungsstellen des aktiven Zentrums zusammen mit dem Inhibitor MTX fallen drei Positionen auf, an denen Ladungen auftreten können (Abb. 11, Abb. 12):

- die Carboxylgruppe von Asp 26 gegenüber N1 und der 2-Aminofunktion von MTX
- die αCarboxylgruppe von MTX gegenüber Arg 57, Arg 31
- die γCarboxylfunktion von MTX gegenüber His 28

Die Abstände dieser Gruppen zueinander liegen zwischen 2.5 und 4.0 Å.

Die pK-Werte der entsprechenden Gruppen sind aus der Literatur bekannt (Tab. 7).[53,94,95]

Aus der Tabelle wird ersichtlich, daß die Frage des Auftretens von Ladungen bei vollkommener Hydratation positiv zu beantworten wäre. Von vollkommener Hydratation der fraglichen Bereiche kann aber nicht gesprochen werden (Abb. 12). Im ersten zu betrachtenden Fall ist Wasser 201 3.3 Å von der 2-Aminofunktion von MTX entfernt und kann kaum eine Wasserstoffbrücke ausbilden. In der Nähe der Carboxylgruppe befindet sich ein einziges H_2O Molekül 253. Dieses H_2O-Molekül steht jedoch über einer Wasserbrücke, gebildet aus 2 Wassermolekülen, mit Solvatationswasser an der Oberfläche des Enzyms in Verbindung.

Zur αCarboxylgruppe von MTX ist H_2O 331 in der Lage, eine H-Brücke auszubilden.

Zur γCarboxylgruppe sind zwei Wassermoleküle befähigt, Wasserstoffbrücken zu bilden (443, 621).

Tab. 7 Die pK-Werte für Methotrexat, Asparaginsäure, Histidin und Arginin

	N1	α-Carboxylf.	γ-Carboxylf.
Methotrexat	5.7	3.36	4.7
	pK_{b2}		
Histidin	6.0		
Arginin	12.48		
	pK_{s2}		
Asparaginsäure	3.86		

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben bei der Beantwortung der Frage, ob innerhalb von Proteinkomplexen Ladungen auftauchen.

Claude Hèlène spricht bei der Betrachtung von Protein-Nukleinsäurekomplexen von abnormalen pK-Werten, die Aminosäuren annehmen können.[96] So zeigt die Ausbildung von H-Brücken-Komplexen zwischen nichtionisierten sauren Aminosäuren und Purin-, bzw. Pyrimidinbasen, daß Asparaginsäure und Glutaminsäure unter physiologischen Bedingungen in neutraler Form existieren können.[97]

Im Gegensatz zu diesen Aussagen deuten eine Reihe von spektroskopischen und kalorimetrischen Untersuchungen auf das

Auftreten einer Ladung, zumindest am N1 des Pteridinringes, beim Binden von MTX hin.
UV-spektroskopische Untersuchungen von Hood et.al. am L.c.-Enzym werden mit einer Protonierung von MTX am Pteridinring interpretiert.[98] Nach der gleichen Arbeit soll eine Protonierung des reduzierten Pterinringes von DHF nicht auftreten. Der unterschiedliche Ladungsstatus wird zur Erklärung der 2000-fach stärkeren Bindung von MTX gegenüber DHF herangezogen.

Raman-spektroskopische Arbeiten von Saperstein et.al., durchgeführt am Enzym von E.coli, unterstützen diese Vermutung. Die Autoren finden für den Pteridinring von MTX im freien protonierten Zustand eine ähnliche Bande wie im gebundenen.[99] Raman-spektroskopische Beobachtungen von Ozaki et.al. am gleichen Enzym deuten in diesselbe Richtung.[100]
^{13}C NMR-Untersuchungen von Cocco et.al. am MTX-DHFR-Komplex von Streptococcus faecium[101] und L. casei[102] werden so interpretiert, daß MTX am N1 protoniert wird. Zusätzlich wurden UV-spektroskopische Beobachtungen angestellt, die auch in Richtung einer Ladung interpretiert werden. Jedoch stellen Cocco et.al. fest, daß die erhaltenen Spektren nicht allein mit Hilfe einer Protonierung hinreichend erklärt werden können, sondern, daß die Verhältnisse im aktiven Zentrum des Enzyms komplizierter sind.[102] Zu einer gleichen Interpretation ihrer Ergebnisse kommen auch Ozaki et.al.[100]

Für TMP zeigen ^{13}C NMR-Beobachtungen von G.C.K. Roberts et.al. am Enzym von L. casei ebenfalls das Auftreten einer Ladung an der 2,4-Diaminopyrimidin-Teilstruktur.[103]
Nicht zuletzt ergeben kalorimetrische Messungen von S. Subramanian et.al., daß der Enthalpiewert der MTX-DHFR-Wechselwirkung mit einer Protonierung verbunden sein muß,

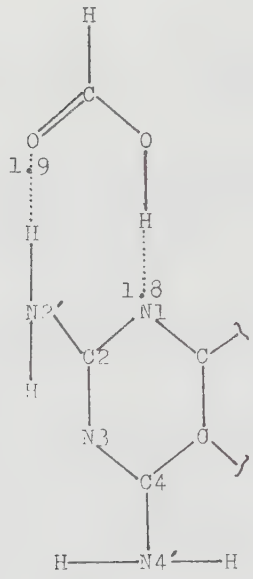
die für Folat ausbleibt. Diese Untersuchungen wurden an der Hühnerleber-Dihydrofolat-Reduktase durchgeführt.[104]
Nach den experimentellen Studien ist es demnach sicher, daß zumindest am N1 des Pteridinringes im Wechselwirkungskomplex MTX-DHFR eine positive Ladung auftaucht. Die beiden anderen fraglichen Bereiche sind damit aber immer noch nicht abgeklärt.

Es wurde deshalb versucht auf theoretischem Wege eine Antwort auf die Frage nach dem Ladungsstatus der ausstehenden Bereiche zu erhalten. Zudem wurde auch der Asparaginsäure-Pterin-Komplex der gleichen Untersuchung unterzogen, obwohl die Antwort aufgrund der experimentellen Ergebnisse schon gegeben ist. In diesem Fall sollte überprüft werden, ob die theoretische Methode zu dem gleichen Ergebnis führt, wie es durch das Experiment vorgegeben ist.
Zur Bearbeitung der Fragestellung wurde das CNDO/2-Programm gewählt.[105-107] Dieses Verfahren wird vielfach bei der Betrachtung von H-Brückensystemen eingesetzt.[108-110]
Eine solche Untersuchung kann jedoch nicht gleichzeitig das gesamte MTX-Molekül und die betroffenen Aminosäuren umfassen, da die Rechenanlage aufgrund des hohen Speicherbedarfs nur Molekülkomplexe mit maximal 100 Orbitalen mit doppelter Präzision berechnen kann.
Die zu betrachtenden Bereiche mußten also durch geeignete Reste simuliert werden. Zudem wurden die in der Röntgenstruktur angegebenen Wassermoleküle bei der Bearbeitung des Problems nicht berücksichtigt, weil jede Konformationsänderung der Molekülkomplexe Auswirkungen auf die Orientierung der Wassermoleküle hat. Eine Simulation, die diese Bedingungen berücksichtigt, ist aber zu rechenintensiv und aufwendig.
Zur Simulation des Wechselwirkungskomplexes Asparaginsäure und MTX wurden Ameisensäure und 2,4-Diaminopteridin eingesetzt. Die pKs-Werte von Ameinsensäure und Asparaginsäure

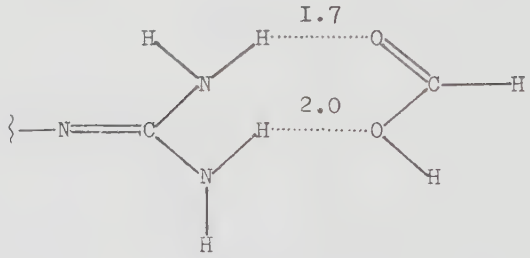
sind sich mit den Werten von 3,77 bzw. 3.86 sehr ähnlich.[53,111]

Der Molekülkomplex wurde in unterschiedlichen Konformationen unter Berücksichtigung von geladenen und neutralen Einzelkomponenten betrachtet und sein Gesamtenergieinhalt berechnet. Es wurde der Energieinhalt bestimmt vom Formiat-Anion und dem am N1 protonierten Pteridinring sowie 12 ungeladene Konformationen der Ameisensäure zusammen mit dem 2,4-Diaminopteridinring.
Diese 12 Konformationen wurden erhalten durch Drehung des Säurewasserstoffs in 60 Grad-Einheiten um die C-O Achse der Ameisensäure. Auf diese Weise nahm er verschiedene Positionen gegenüber dem N1-Stickstoff des Pteridinringes ein (Abb. 15a). Ebenso wurde der Wasserstoff durch Drehung der Carboxylfunktion um 180° der 2-Aminofunktion gegenüber positioniert. Auch in dieser Position wurde er über Drehungen von 60 Grad-Einheiten in verschiedene Stellungen gegenüber der 2-Aminofunktion des Pteridinringes gebracht (Abb. 15a).
Die gleichen Geometrien wurden für das System berechnet, in dem 2,4-Diaminopteridin durch 2,4-Diamino-8-oxidopteridin ersetzt war. Die Ergebnisse sind eindeutig.
In den Berechnungen zeigt sich, daß das Auftreten von Ladungen, im Gegensatz zu den oben erwähnten experimentellen Befunden, um vieles energetisch ungünstiger ist (48 Kcal) als die Ausbildung von H-Brücken unter Beibehaltung der neutralen Einzelmoleküle. Für den N-Oxid-Komplex ist die Formulierung von Ladungen sogar um über 65 Kcal ungünstiger als die Annahme ungeladener Einzelkomponenten.

15A



15B



15C

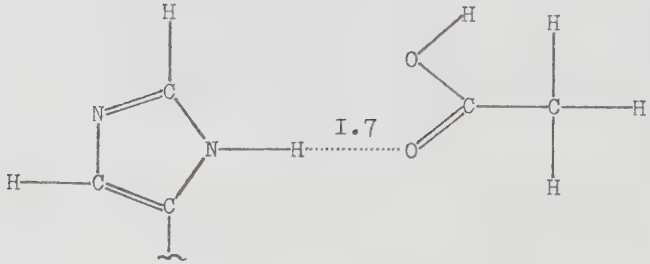


Abb. 15 Die drei untersuchten H-Brückensysteme in ihrer optimalen Geometrie (nach CNDO/2-Berechnungen, Angaben in Å)

Zur Untersuchung des zweiten Problems wurden folgende Verbindungen eingesetzt: Ameisensäure für die αCarboxylgruppe von MTX, jeweils Methylguanidin für Arg 31 und Arg 57.

Auch für diesen Molekülkomplex wurden die Energieinhalte unter Berücksichtigung von geladenen und neutralen Einzelmolekülen in unterschiedlichen Konformationen berechnet. Sie wurden berechnet für das Formiat-Anion zusammen mit den beiden Basen, wobei in jeder Berechnung ein anderer Stickstoff der Methylguanidinmoleküle protoniert war. Weiterhin wurden 12 Konformationen untersucht, die die neutralen Einzelmoleküle beinhalten. In die Berechnungen gingen die gleichen 12 unterschiedlichen Konformationen der neutralen Ameisensäure im Molekülkomplex mit den beiden Basen ein, wie sie oben für den Komplex mit dem Pteridinring beschrieben worden sind.

Auch in diesem Fall zeigt sich die Ausbildung von H-Brücken zwischen ungeladenen Molekülen günstiger als die Formierung von Ladungen. Der Molekülkomplex wird über zwei Wasserstoffbrücken stabilisiert, die sich zwischen der Säure und Methylguanidin 57 ausbilden (Abb. 15b). Nach den CNDO/2 Berechnungen ist dieser Zustand gegenüber der Ausbildung von Ladungen nur noch um 2.7 Kcal begünstigt. Das bedeutet, daß aufgrund der CNDO-Ergebnisse in diesem Fall mit einem teilweisen Auftreten von Ladungen gerechnet werden kann.

Der dritte Bereich wurde durch Histidin und Essigsäure dargestellt. Der pKs-Wert der γCarboxylgruppe entspricht mit 4.7 etwa dem der Essigsäure mit 4.76.[111] Es wurden wiederum die Gesamtenergieinhalte des Komplexes berechnet mit geladenen und neutralen Einzelkomponenten in unterschiedlichen Konformationen. Den stabilsten Zustand zeigt Abb. 15c. Der Komplex mit ungeladenen Einzelmolekülen ist

gegenüber dem mit der Ausbildung von Ladungen um 40 Kcal begünstigt.

In dem vorgestellten Ergebnis wird deutlich, daß der theoretische Ansatz mit Hilfe des semiempirischen quantenchemischen Verfahrens CNDO/2 im Falle der Asparaginsäure-Pterin-Wechselwirkung nicht zum gleichen Resultat kommt wie die experimentellen Befunde. Ob dies an der Nichtberücksichtigung von Wasser innerhalb des Komplexes liegt oder eine Schwäche des Programmes ist, kann nicht gesagt werden. Es sollen nun zwei Wechselwirkungskomplexe für alle Inhibitoren mit dem aktiven Zentrum der DHFR berücksichtigt werden.

A: Wie als Resultat aus den CNDO/2-Berechnungen erhalten, sollen weitgehend keine Ladungen im Wechselwirkungskomplex berücksichtigt werden.

B: Es sollen in allen drei fraglichen Bereichen Ladungen angenommen werden, analog den experimentellen Befunden für die Pteridin-Asparaginsäure-Wechselwirkung.[99-104]

Am Ende der Untersuchung sollen beide Modelle miteinander verglichen und ausgewertet werden. Eine detaillierte Beschreibung beider Modelle findet im nächsten Abschnitt statt.

C4 Die beiden Modelle des Wechselwirkkungskomplexes

In Modell A sind aufgrund der CNDO/2-Berechnungen für alle Inhibitoren außer 6e, 6f keine Ladungen innerhalb des Wechselwirkungskomplexes berücksichtigt. Da sich nach dieser Methode die Ausbildung von H-Brücken zwischen Ligand und Bindungsstelle als so günstig erweist, sind die Inhibitoren 6a, 6b, 7a gegenüber His 28 und Arg 57 so ausgerich-

tet, daß sich O-H-N Brücken ausbilden können. Die Alkohol- und Esterfunktionen von 6a, 6b, 7a bilden also in diesem Modell H-Brücken aus, ebenso wie die Carboxylgruppen von MTX, DCMTX, 7-MeMTX, 7-MeDCMTX. Insgesamt sind die Atome der R1-Substituenten, die zu den Atomen CA, CT, CB, CG, CD von MTX analog sind, in eine ähnlich Position gebracht, wie für MTX durch die Kristallstruktur vorgegeben (Abb. 1, Abb. 10, Abb. 11).

Für die Verbindungen 6e und 6f ergibt sich für den Bereich der R1-Substituenten eine andere Situation als für die restlichen Derivate.

Die R1-Reste dieser Derivate sind gegenüber den anderen Substituenten sehr klein (Abb. 10). Beim Binden dieser Liganden können His 28 und Arg 31, die an der Öffnung des aktiven Zentrums liegen, solvatisiert werden, weil Raum, der bei den anderen Inhibitoren durch die R1 Reste eingenommen wird, in diesen Fällen Wasser zugänglich ist. Dies gilt ebenso für die Carboxylgruppe von 6e, die beim Binden das aktive Zentrum nach außen abschließt. Arg 57 bleibt weiterhin einer Solvatation nahezu unzugänglich, da es mit seinem basischen Anteil in einer hydrophoben Tasche zwischen CA, CB, CG von Arg 31 und CB, CG, CD1, CD2 von Leu 54 liegt (Abb. 11)[49]

Zur Berechnung der Wechselwirkungsenergie ist daher für die Liganden 6e und 6f Arg 31 als Kation eingesetzt, die Substanz 6e selbst als Anion. (Dimethylaminobenzoesäure besitzt einen pKs von 6.0)[112]

Im Modell B sind innerhalb des Inhibitor-Protein-Komplexes Ladungen eingesetzt. Arg 31 und Arg 57 sind am NE protoniert (Abb. 35,43). Alle Carboxylfunktionen sind als Anion in den Wechselwirkungskomplex eingesetzt (Abb. 29, 54, 62). Alle Inhibitoren tragen am N1 des Pteridinringes eine positive Ladung (Abb. 48, 50, 52).

Die Carboxylfunktionen der Verbindungen MTX, 7-MeMTX, DCMTX, 7-MeDCMTX sind so positioniert wie in der Kristallstruktur angegeben (d.h. sie sind gleich positioniert wie in Modell A). Die R1-Substituenten der Substanzen 6a, 6b, 6c, 7a sind dagegen ganz anders ausgerichtet als im ersten Wechselwirkungskomplex. Sie sind von der polaren Region Arg 31 und 57 ab- und zu gegenüberliegenden hydrophoberen Bereichen hingedreht. Deutlich wird dies in Abbildung 16 und 17, die die Ausrichtung des R1-Substituenten von 6b im Wechselwirkungsmodell A und B zeigen.
Die Verbindung 6d ist in beiden Modellen in der gleichen Konformation eingesetzt. Für den Adamantan-Körper ist eine unterschiedliche Ausrichtung nicht möglich, da er kaum in das aktive Zentrum hineinpaßt und ohne Änderung an der Geometrie der Bindungsstellen nicht gedreht werden kann.

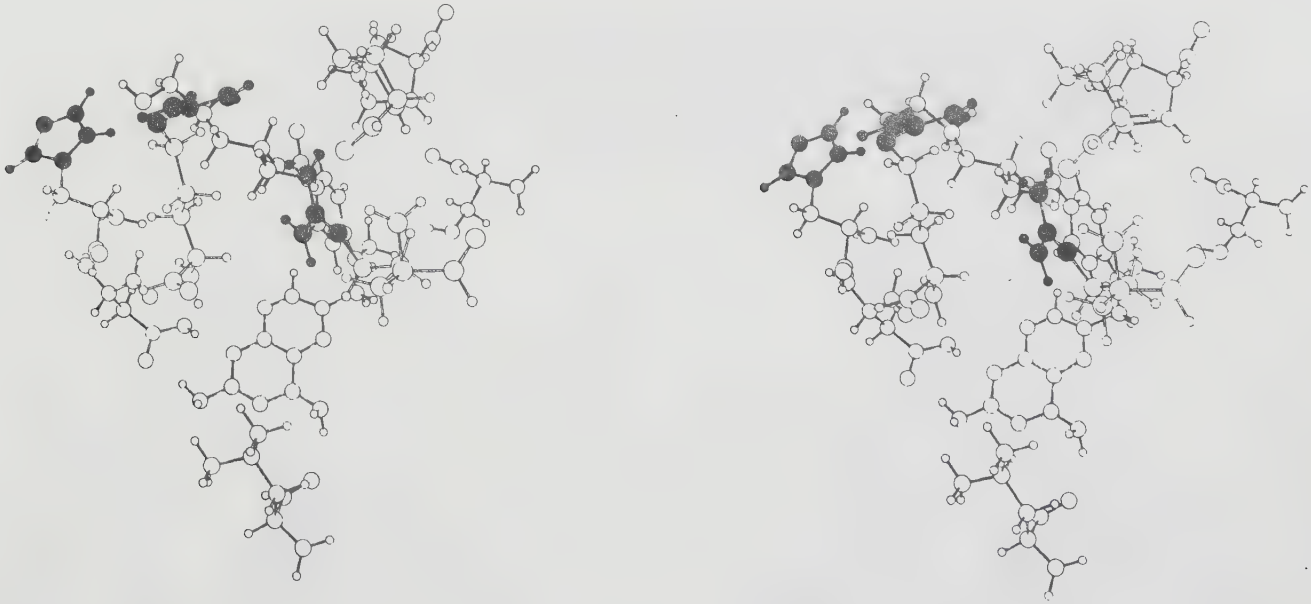


Abb. 16 Die Verbindung 6b im aktiven Zentrum der DHFR. Es sind der Übersicht wegen nur 9 der 20 Bindungsstellen dargestellt. Der R1-Substituent (hervorgehoben über dunklere Bindestriche) ist auf die polaren Anteile (schwarz dargestellt) der Aminosäuren His 28, Arg 31 und Arg 57 ausgerichtet und ist zu H-Brückenbindungen befähigt. Modell A

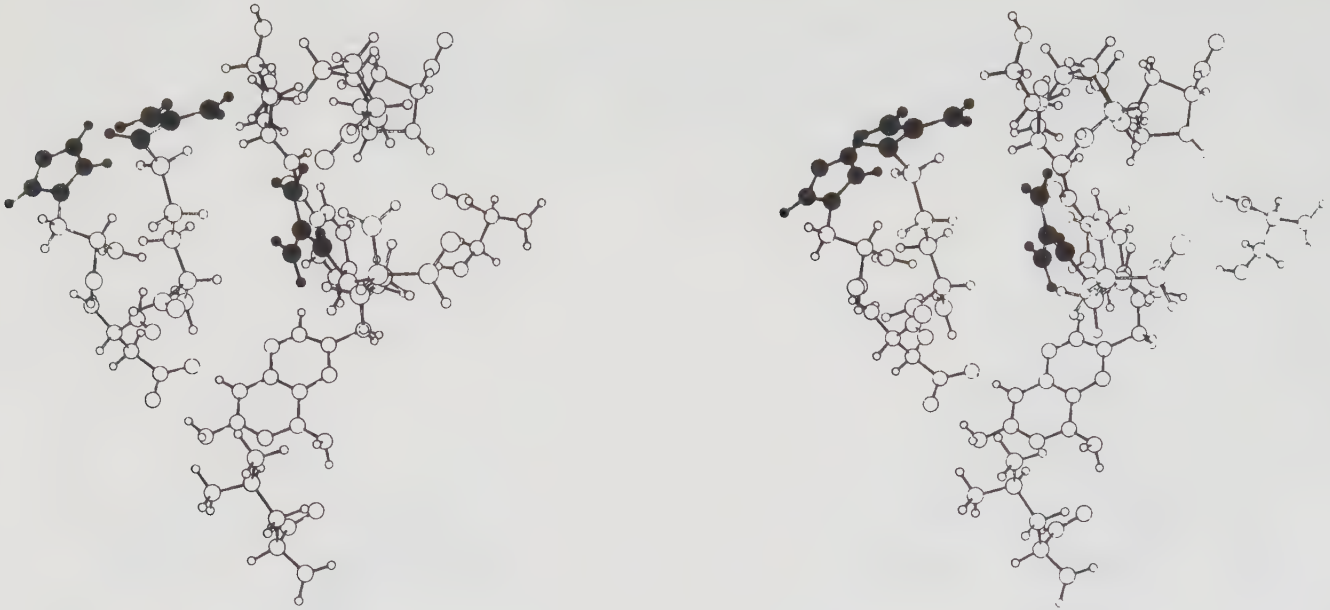


Abb. 17 Die Verbindung 6b im aktiven Zentrum der DHFR. Es sind der Übersicht wegen nur 9 der 20 Bindungsstellen dargestellt. Der R1-Substituent (hervorgehoben über dunklere Bindungsstriche) ist von den polaren Bereichen (schwarz dargestellt) der Aminosäuren His 28, Arg 31 und Arg 57 abgedreht. Arginin 31 und Arginin 57 tragen eine positive Ladung. Modell B

C5 Berechnung der Wechselwirunsenergien zwischen aktivem Zentrum und den Liganden

C5.1 Berechnung der Wechselwirkungsenergie mit der Programmreihenfolge IEHT, MOMENT, INTOC

Simon konnte zeigen, daß die Programmreihenfolge IEHT, MOMENT, INTOC ein geeignetes rechentechnisches Verfahren darstellt, um den WW-Komplex von Sulfonamiden mit dem aktiven Zentrum der Humanerythrocytencarboanhydrase C zu beschreiben.[74]
In dieser Arbeit sollten deswegen die gleichen Verfahren eingesetzt werden:

- Berechnung der Ladungsverteilung mit dem IEHT-Programm[86,87]
- Berechnung der elektrischen Momente höherer Symmetrie, Quadru- und Oktupole, mit dem Programm MOMENT.[113-115]
- Berechnung der WWE mit dem Programm INTOC, einem Multipolbindungspolarisierbarkeitsverfahren.[116]

Die 20 Bindungsstellen konnten jeweils als Ganzes mit den Programmen bearbeitet werden. Die Liganden allerdings sind zu umfangreich, als daß sie als eine Einheit berechnet werden könnten.
Diese Verbindungen wurden in zwei oder drei sich überlappende Segmente geteilt, damit eine Berechnung der Ladungsverteilung sowie der Di-, Quadru- und Oktupole vollzogen werden konnte. Zur Berechnung der Wechselwirkungsenergie wurden die Teile wieder zu ursprünglichen Verbindungen zusammengesetzt.

Erste Resultate mit dieser Methode zeigten sehr schnell, daß dieses Verfahren zur Behandlung des hier anstehenden Problems nicht geeignet ist.

So ergab sich für die WW des Inhibitors MTX zu den Bindungsstellen Asp 26, Leu 27, His 28 eine Wechselwirkungsenergie von -2599.9 Kcal. (E_{el}=-8.38, E_{pol}=-2637.4, E_{dis}=-9.77, E_{rep}=+55.65 Kcal). Dieser Betrag ist unrealistisch hoch. Selbst bei einer Vergrößerung des Abstandes der Bindungsstellen vom Inhibitor um 0.1 Å, die aufgrund einer mittleren Unsicherheit in der Positionierung der Atome von 0.15 Å noch zu rechtfertigen gewesen wäre, wurden noch Energien von über 1500 Kcal errechnet.[49] Eine weitere Entfernung um 0.2Å ergab eine Verringerung der WWE auf immer noch zu hohe 565 Kcal.

Die Ursachen für die Nichtanwendbarkeit des Verfahrens für dieses Problem liegt darin begründet, daß die Störungstheorie, auf der das Programm zur Ermittlung der WWE, INTOC, aufbaut, von ungestörten separierten Systemen ausgeht. Dieser Ansatz ist zur Beschreibung von Wechselwirkungsphänomenen, bei denen es nicht zur Unterschreitung von van der Waals-Radien kommt, gut geeignet. Der Ansatz der Methode wird aber unzuverlässig, wenn es zu Überlappungen der Wellenfunktionen kommt und ein Elektronenaustausch nicht mehr zu vernachlässigen ist. Von separierten Systemen darf dann eigentlich nicht mehr ausgegangen werden.[117,118]

Innerhalb der Störungstheorie wird die Wechselwirkungsenergie in Einzelenergien zerlegt, die bestimmte physikalische Bedeutung besitzen. Im INTOC setzt sich die Energie wie folgt zusammen (Gl. 3):

$$E = E_{el} + E_{pol} + E_{dis} + E_{rep} \qquad \text{(Gl. 3)}$$

E_{el} ist der elektrostatische Term, E_{pol} die Polarisations-, E_{dis} die Dispersionsenergie und E_{rep} der Abstoßungsterm.[116] Wie erwähnt, vermögen diese Terme Wechselwirkungsenergien bei größeren und mittleren Abständen

gut wiederzugeben. Der Repulsionsterm schaltet sich bei Abständen unterhalb von 4Å ein. Dieser Term ist nach einer empirischen Formel entwickelt, die aus Kristallgitterenergien von Kohlenstoffatomen abgeleitet wurde.[119]

Bei der Betrachtung der Energiebeträge, aus denen sich die vorhin erwähnten WWE von 2600 Kcal zusammensetzten, fällt auf, daß die Repulsionsenergie (+55.65 Kcal) viel zu klein ist. Rein, einer der Mitautoren des INTOC-Programmes erwähnt selbst, daß der Repulsionsterm für kurze Abstände nicht geeignet sei. Nach seiner Erfahrung ist die Berechnung von Wechselwirkungsenergien mit der INTOC Methode nur für schwache Wasserstoffbrückensysteme verläßlich (2,2 - 2,4 Å).[118]

C5.2 Eine empirische Formel zur Berechnung der Wechselwirkungsenergie

In einer Veröffentlichung über Purin-Aminosäure-Wechselwirkungen, bei der auch Rein Mitautor ist, wird zur Berechnung von Wechselwirkungsenergien, insbesondere zur Behandlung von H-Brücken, eine rein empirische Formel angewandt.
Die Gesamtwechselwirkungsenergie setzt sich bei diesem Verfahren aus drei Termen zusammen (Gl. 4).[120]

$$E_{(tot)} = E_{el} + E_{nonbond} + E_{H\text{-}bond} \qquad \text{(Gl. 4)}$$

Die elektrostatische Komponente setzt sich wie folgt zusammen (Gl. 5):

$$E_{el} = \sum_{i,j} \frac{q_i \; q_j}{e \; r_{ij}} \qquad \text{(Gl. 5)}$$

Dabei ist q die mit dem CNDO/2 Programm errechnete Atomladung, e steht für die Dielektrizitätskonstante und r_{ij} kennzeichnet den Abstand der beiden Punktladungen, zwischen denen jeweils der elektrostatische Energiebeitrag errechnet wird. E_{el} wird errechnet zwischen allen Punktladungen des einen Moleküls (i) mit allen Ladungen des zweiten Moleküls (j).
e nimmt bei allen Berechnungen in Modell A (d.h. in den Wechselwirkungskomplexen ohne Einsatz von Ladungen bis auf die Substanzen 6e, 6f) den Wert 1 an, wenn kein Wasser zwischen den wechselwirkenden Molekülen ist, und 2, wenn der Abstand r groß genug ist, daß Wasser zwischen die Moleküle treten kann. Diese Zahlenwerte stellen eine grobe Näherung dar und sind von Gardüno et.al. übernommen.[120]
Zur Berechnung des elektrostatischen Wechselwirkungsterms zwischen geladenen oder mehrfach geladenen Molekülen ist es sehr schwierig, eine passende Formel zu finden. Schwierigkeiten bereitet es, einen brauchbaren Wert für die Dielektrizitätskonstante einzusetzen. So benutzen Kollmann et.al. bei der Untersuchung von DNA-Fragmenten sowohl abstandsabhängige Dielektrizitätskonstanen als auch konstante Dielektrizitätsparameter.[121]

Webb gibt Formeln zur Berechnung der Dielektrizitätskonstanten in Abhängigkeit vom Abstand an, in denen die Temperatur und der Ladungsstatus der Moleküle berücksichtigt sind.[122]
Die Formel $e = 6r_{ij}-7$ zur Berechnung der Dielelektrizitätskonstanten stammt von Convay und ergibt nach Aussage von Webb vernünftige Werte. Diese Formel ist vielfach variiert von $e = 6r_{ij}-11$ bis $e = 6r_{ij}-25$. Mit diesen Modifikationen will man der Temperatur sowie der Erhöhung der Feldstärke von mehrfach geladenen Molekülen Rechnung tragen.[122]

Nach Versuchen mit mehreren modifizierten Gleichungen zur Errechnung der Dielektrizitätskonstanten ist Gl. 6 im WW-Modell B eingesetzt worden. Auch diese Formel kann nur eine Annäherung darstellen, wenn man berücksichtigt, daß der R1-Substituent der Verbindung MTX 2-fach negativ geladen ist, hingegen die Verbindungen 6a, 6b, 6c, 6f, 7a und 7d in diesem Bereich neutral sind.

$$e = 6r_{ij}-15 \qquad \text{(Gl. 6)}$$

Gl. 7 gibt die Formel zur Berechung der nonbond-Energie wieder.

$$E_{nonbond} = \sum_{i,j} \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{6}} \qquad \text{(Gl. 7)}$$

B_{ij} stellt einen Abstoßungsparameter für die Atome i und j der zwei wechselwirkenden Moleküle dar, A_{ij} den entsprechenden Anziehungsparameter. r_{ij} gibt den Abstand der beiden wechselwirkenden Atome wieder. Es erfolgt eine Aufsummierung der $WWE_{nonbond}$ über alle Atome des einen Moleküls (i) mit allen Atomen der anderen Moleküls (j), ausgenommen des Wasserstoffatoms sowie des Wasserstoffakzeptors, die an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind. Die Parameter A_{ij} und B_{ij} stammen von Hopfinger und sollen näher erläutert werden.[123]

Allgemein soll eine Funktion zur Beschreibung der Wechselwirkungen zweier Atome, die nicht miteinander verbunden sind, folgende Kräfte berücksichtigen (Gl. 8):

$$E(r_{ij}) = \left[N(i)\middle|N(j)\right] + \sum_k \left[N(i)\middle|e_j(k)\right] + \sum_l \left[N(j)\middle|e_i(l)\right] + \sum_k \sum_l \left[e_i(l)\middle|e_j(k)\right] \quad \text{(Gl. 8)}$$

Kern-Kern — Kern-Elektron — Kern-Elektron — Elektron-Elektron

In der Praxis werden solche paarweisen Wechselwirkungen und die Abhängigkeit der WWE vom Abstand beispielsweise durch die 'Lennard-Jones 6-12 Potential Funktion' beschrieben (Gl. 9):

$$E_{ij} = e_o \quad (r_o/r_{ij})^{12} - 2(r_o/r_{ij})^6 \quad \text{(Gl. 9)}$$

r_o ist der Abstand am Energieminimum
e_o ist die Minimumenergie bei $r_{ij}=r_o$

Der Anziehungsterm $-2(r_o/r_{ij})^6$ ist abgeleitet für ein Paar identischer, kugelsymmetrischer und chemisch gesättigter Moleküle, wohingegen der Repulsionsterm eine Annäherung darstellt und nicht exakt abgeleitet werden kann. Der Anziehungsterm entsteht aus der Anziehung von induzierten Dipolen in zwei frei rotierenden Molekülen. Induzierte Quadru- und Oktupole sind vernachlässigt. Die Parameter r_o und e_o werden von experimentellen Befunden abgeleitet, könnten aber ebenso gut aus quantenmechanischen Berechnungen stammen.

Wird Gl. 9 dazu benutzt die Wechselwirkung zwischen nicht miteinander verbundenen Atomen von Molekülen zu beschreiben, so erhält sie die Form von Gl. 7.
Bei Anwendung von Gl. 7 zur Berechnung der WWE zwischen Paaren nicht miteinander verbundener Atome oder Atomgruppen wird angenommen, daß die Zerstörung der Kugelsymmetrie und die Einführung von Ladungen nur die Tiefe und Position der

Wechselwirkungsenergie beeinflußt (vgl. die Randbedingungen zur Ableitung des Anziehungsterms).
Ob diese Annahme Gültigkeit besitzt, ist allerdings ein umstrittener Punkt.
Der Anteil der Wechselwirkungsenergie, der auf die Ladungsverteilung der Moleküle zurückzuführen ist, soll von der WWE, beschrieben durch die Lennard-Jones-Funktion, separierbar sein. Das bedeutet, daß die elektrostatische Energie von der nonbond-Energie, die induzierte Dipole berücksichtigt, separierbar sein soll.[123]

Der Anziehungstermkoeffizient A_{ij} in Gl. 7 kann bestimmt werden über Anwendung der Slater-Kirkwood Gleichung, in einer etwas modifizierten Form von Scott und Scheraga (Gl. 10):

$$A_{ij} = \frac{\frac{3}{2}\, e(h/m^{1/2})\ \alpha_i\ \alpha_j}{C_{ij}} \qquad \text{(Gl. 10)}$$

$$\text{wobei } C_{ij} = (\alpha_i/N_{eff}^{(i)})^{1/2} + (\alpha_j/N_{eff}^{(j)})^{1/2} \qquad \text{(Gl. 11)}$$

In den Ausdrücken steht m für die Elektronenmasse, e für die Elementarladung, α_i und α_j für die Atompolarisierbarkeit der Atome i bzw. j. N_{eff} ist ein Korrekturfaktor, der die Natur, Stärke und Orientierung der Bindungen, die die beiden wechselwirkenden Atome eingehen, in Rechnung stellen soll. Dem Wesen nach stellt N_{eff} die effektive Anzahl von Elektronen dar, die den Kern umgeben, wenn das Atom chemisch in einer bestimmten Art gebunden ist.[123]

Der Repulsionstermkoeffizient B_{ij} wird berechnet ausgehend von Gl. 7, die nach dem Abstand r differenziert wird (Gl. 12):

$$\frac{dE_{nonbond}}{dr} = \frac{6A_{ij}}{r^7_{ij}} \cdot \frac{12B_{ij}}{r^{13}_{ij}} \qquad (Gl. 12)$$

Für das Energieminimum ($r_{ij} = r_o$) gilt:

$$\frac{dE_{nonbond}}{dr_o} = 0 = \frac{6A_{ij}}{r^7_o} - \frac{12B_{ij}}{r^{13}_o} \qquad (Gl. 13)$$

Gleichung 13 kann nach B_{ij} aufgelöst werden:

$$1/2\ A_{ij} r_o^6 = B_{ij} \qquad (Gl. 14)$$

Man kann einen Grenzkontakt r_o' für jede Funktion berechnen, indem der Wert r_{ij} bestimmt wird, für den $E_{nonbond}$ gleich Null wird. Wenn die Funktion realistisch ist, sollte der berechnete Wert r_o' mit entsprechenden Werten aus kristallographischen Untersuchungen identisch sein.
Die Werte A_{ij} und B_{ij} wurden aus 'Conformational Properties of Macromolecules ' von A.J. Hopfinger entnommen.[123]

Zur Berechnung der $E_{H\text{-}bond}$ wird Gl. 15 eingesetzt:

$$E_{H\text{-}bond} = \frac{A_i}{r^{12}_{ij}} - \frac{B_j}{r^6_{ij}} \qquad (Gl. 15)$$

Hierbei ist i der Akzeptor und j das Wasserstoffatom. Die

Parameter A bzw. B stammen von McGuire et.al.[124] und sind bestimmten Typen von H-Bindungen zugeordnet.
Sie stammen aus einer Untersuchung von Wasserstoffbrückensystemen, die mit Hilfe des CNDO/2-Verfahrens berechnet sind. Zur Ermittlung der Werte wurde eine theoretische Wechselwirkungsenergie E_{TWE} bestimmt (Gl. 16):

$$E_{TWE} = E_{CNDO/2} - (E_{nonbond} + E_{el}) \quad \text{(Gl. 16)}$$

E_{TWE} soll also $E_{H\text{-}bond}$ reproduzieren.

Obwohl in dem Term zur Berechnung der H-Brückenenergie keine Winkelabhängigkeit vorhanden ist, vermag diese einfache Parametrisierung Wasserstoffbrücken nach Aussagen von McGuire et.al. gut zu beschreiben.[124]

C.5.2.1 Überprüfung des Programmes zur Berechnung der Wechselwirkungsenergie

Das Programm nach Gl. 4 wurde nach den oben erwähnten Angaben und Daten geschrieben. An kleinen Wechselwirkungskomplexen wurde die Anwendbarkeit überprüft. Dazu wurden drei Systeme betrachtet:
- 2,4-Diaminopteridin mit Asp 26
- Ethan mit der Bindungsstelle His 28
- Ethanol mit der Bindungsstelle His 28

Die Komponenten der Systeme wurden in verschiedenen Abständen zueinander untersucht und die WWE einmal nach der empirischen Formel (Gl. 4), sowie mit dem CNDO/2-Verfahren bestimmt. Die Berechnung der WWE mit der CNDO/2-Methode kann nicht in einem Schritt erfolgen und bedarf einigen Aufwandes.

Es müssen die Gesamtenergieinhalte des Molekülkomplexes errechnet werden (z.B. Histidin-Ethan) sowie die Energien der Einzelmoleküle. Die WWE ergibt sich aus der Differenz der Energiebeträge der Einzelmoleküle zur Gesamtenergie des Molekülkomplexes.[117,125]
Es wurden mit beiden Verfahren 30 identische WW-Komplexe berechnet und die Energiebeträge einander gegenübergestellt (Abb. 18). Für die 30 Wertepaare ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von 0.92 und ein Regressionskoeffizient von 0.94. Damit ist festgestellt, daß das Programm anwendbar ist. Das Programm ist im Anhang abgedruckt.

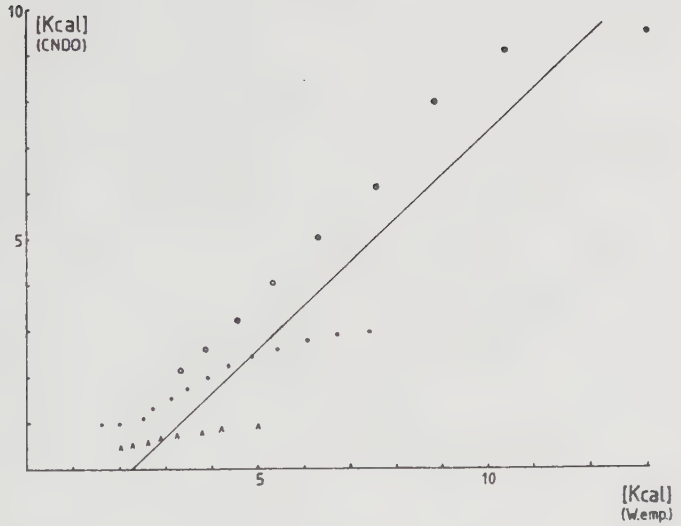


Abb. 18 Vergleich der WWE berechnet mit dem CNDO/2-Verfahren und nach Gl. 4
• Asp 26 - 2,4-Diaminopteridin
• His 28 - Ethanol
▲ His 28 - Ethan

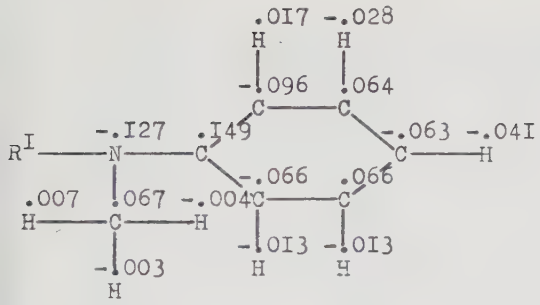
C5.2.2 Berechnung der WWE nach der empirischen Formel

Ziel der Arbeit ist es, die WWE zwischen den 20 Bindungsstellen und den Liganden zu berechnen. Die Ladungsverteilung, die in den E_{el}-Term der Gl. 4 eingeht, ist mit dem CNDO/2-Verfahren berechnet. Die 20 Bindungsstellen konnten mit dieser Methode als Einheit abgehandelt werden (Abb. 24-46). Da das Programm nur 100 Orbitale gleichzeitig berechnen kann, mußten die Inhibitoren in zwei sich über-

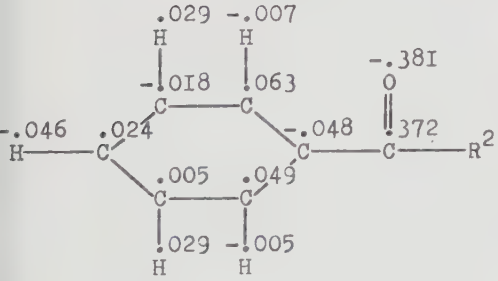
lappende Segmente geteilt werden. Ein solches Segmentpaar, das zusammen den Inhibitor MTX ergibt, ist in Abb. 19 dargestellt.

Wie man sieht, läßt sich der Aromat in zwei Teile zerlegen. Die Hälften beider Segmente zum L-Glutaminsäurerest hin erhalten in beiden Segmenten kaum unterschiedliche Punktladungen. Hingegen zeigt der Abschnitt des Aromaten, der die Aminofunktion trägt, größere Abweichungen bei der Ladungsverteilung der zwei sich überlappenden Segmente. Beim Zusammensetzen der Segmente sind für alle Inhibitoren die Unterschiede in der Ladungsverteilung für den Aromaten berücksichtigt. Es ist also der Hälfte des Aromaten, die den R^2-Substituenten trägt (Abb. 19), auch die für das entsprechende Segment ermittelte Ladungsverteilung zugeordnet.
Das gleiche gilt für die Hälfte des Aromaten mit unterschiedlichen R^1-Substituenten. Die Ladungsverteilungen, die in die WWE-Berechnungen eingingen, sind in den Abb. 47-62 dargestellt.

Es soll noch einmal erwähnt werden, daß alle Inhibitoren im WW-Komplex bis auf den L-Glutaminsäureanteil die gleiche Konformation einnehmen, wie sie für MTX durch die Kristallstruktur angegeben wird. Dies gilt sowohl für das WW-Modell A als auch für das WW-Modell B.
Im ersten Modell sind alle Derivate in eine solche Position gebracht, die eine Ausbildung von H-Brücken ermöglicht. Dies gilt für den Pteridinring, sowie für die Carboxyl-, Ester-, und Alkoholfunktionen gegenüber His 28, Arg 31 und Arg 57.



R^I =2,4-Diamino-6-methylpteridin



R^2=L-Glutaminsäure

Abb. 19 Die Ladungsverteilung des Aromaten von MTX innerhalb der beiden Segmente, aus denen die Ladungsverteilung von MTX zusammengesetzt ist.

Im zweiten Modell unter Formierung von Ladungen sind die R1-Substituenten der Verbindungen 6a, 6b, 6c, 7a von dem polaren Zentrum Arg 31 und Arg 57 abgedreht, so daß eine Ausbildung von H-Brücken zu den Bindungsstellen nicht mehr möglich ist (Abb. 17).
Zum ersten WW-Modell ist noch zu bemerken, daß bei der Berechnung der WWE zwischen den Verbindungen 6e und 6f mit einigen Bindungsstellen an der Öffnung des aktiven Zentrums die Dielektrizitätskonstante auf 2 erhöht ist. Als Kriterium dafür dienten Abstandsmessungen zwischen den R1-Substituenten und den Bindungsstellen sowie Betrachtungen von dreidimensionalen Zeichnungen. Die Konstante ist in den Fällen auf 2 erhöht, in denen der Abstand zwischen Rest und Bindungsstelle groß genug ist, daß Wasser zwischen den reagierenden Oberflächen auftreten kann. Die entsprechenden Bindungsstellen sind in Tab. 13 gekennzeichnet.

Die Gesamtwechselwirkungsenergie wurde durch Summation der WWE zwischen Ligand und einzelner Bindungsstelle erhalten. Die Gesamtenergie der 12 Liganden zum aktiven Zentrum ist für beide Modelle in Tab. 8 aufgelistet.
Die Abb. 20 und 21 zeigen die graphische Darstellung des Zusammenhanges zwischen pI_{50}-Werten und den berechneten Wechselwirkungsenergien für alle 12 Verbindungen.

Verbindung	WWE(Kcal) A	WWE(Kcal) B
MTX	-128.71	-138.75
DCMTX	-130.12	-138.25
7-MeMTX	-132.04	-144.45
7-MeDCMTX	-133.56	-145.21
6a	-140.22	-111.07
6b	-124.16	-108.52
6c	-116.98	-107.72
6d	-115.09	-116.49
6e	-120.53	- 98.62
6f	-103.67	-104.37
7a	-148.05	-115.24
7d	-121.35	-120.73

Tab. 8 Die Gesamtwechselwirkungsenergien zwischen den Liganden und aktivem Zentrum der DHFR von L.c. in beiden WW-Modellen.

D DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Abb. 20 und 21 zeigen die graphische Darstellung des Zusammenhanges zwischen den experimentell ermittelten Inhibitorraten und den berechneten Wechselwirkungsenergien nach beiden Modellen.
Zwischen den Ergebnissen der beiden Wechselwirkungsmodelle lassen sich schon auf den ersten Blick Gemeinsamkeiten und Unterschiede feststellen. Deutlich wird aus beiden Abbildungen, daß ein einheitlicher Zusammenhang zwischen berechneter WWE und inhibitorischer Wirksamkeit nicht existiert. Die Lage der Geraden in beiden Abbildungen bedarf einer Rechtfertigung:

Aus spektroskopischen Untersuchungen ist bekannt, daß es nebeneinander sowohl für DHFR-NADPH-Substrat, als auch für DHFR-NADPH-Inhibitor-Komplexe verschiedene Konformationen gibt.[76,126-129] Zwischen den verschiedenen Formen existieren Gleichgewichte, die vom pH und den Liganden abhängig sind. Gronenborn et.al. konnten mit ^{1}H und ^{31}P NMR-Untersuchungen zwei Konformationen für den DHFR-NADP-TMP-Komplex nachweisen, die etwa im Verhältnis 1:1 vorkommen.[76,126] Nach gleichen Beobachtungen existiert der DHFR-NADP-MTX-Komplex nur in einer Konformation.[126] In dem hier angewandten Modell ist diese einheitliche Konformation praktisch für alle Inhibitoren vorausgesetzt.

Kinetische Untersuchungen an kompetitiven-DHFR-Inhibitoren haben gezeigt, daß eine Beschreibung des inhibitorischen Verhaltens über einen linearen kompetitiven Mechanismus allein nicht ausreichend ist.[130,131] Zur Beschreibung der unterschiedlichen Hemmechanismen mußten neue theoretische Ansätze geschaffen werden.[132-134] Es wurden zusätzliche Einteilungen vorgenommen in slow- und slow-tight-binding-Inhibitoren. Dabei deutet der Begriff 'tight' auf die

Fähigkeit der Inhibitoren hin, schon in solchen Konzentrationen zu hemmen, die der Konzentration des Enzyms entspricht. 'Slow' bedeutet, daß einer schnellen Bildung des Primärkomplexes eine langsame reversible Isomerisierungsreaktion folgt.[131]

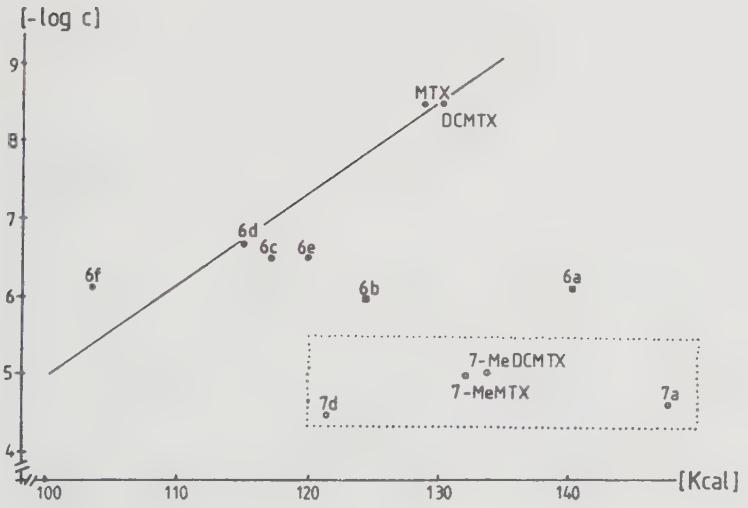


Abb. 20 Graphische Darstellung des Zusammenhanges zwischen experimentell ermittelten PI_{50}-Werten und berechneter WWE. (Modell A)

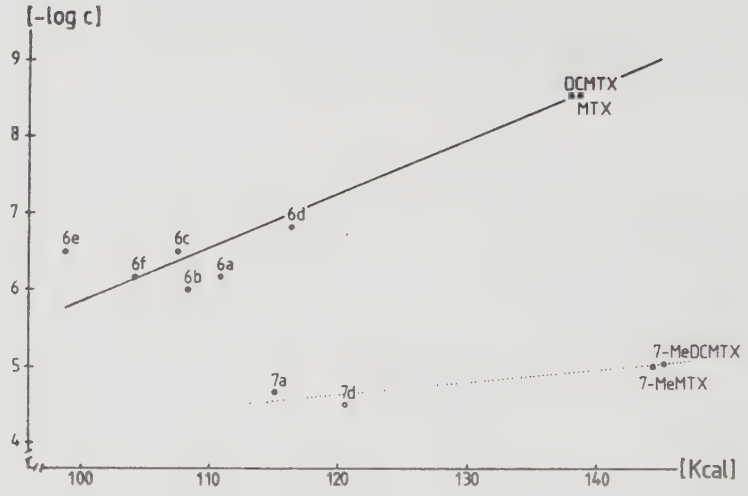


Abb. 21 Graphische Darstellung des Zusammenhanges zwischen experimentell ermittelten pI_{50}-Werten und berechneter WWE. (Modell B)

Den slow-binding-Mechanismus stellt man sich wie folgt vor (Abb. 22):

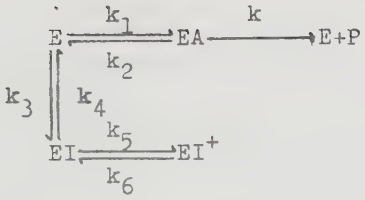


Abb. 22 Mechanismus für slow-binding Inhibitoren, (E=Enzym, I=Inhibitor, A=Substrat, P=Produkt)

EI stellt den Primärkomplex zwischen Inhibitor und Enzym dar und und EI^+ einen Isomerisierungskomplex, der aus dem EI-Komplex in einen langsamen Schritt hervorgeht.

Williams et.al. haben eine Reihe von Inhibitoren hinsichtlich ihres Hemmungstyps an der DHFR von Streptoccoccus faecium untersucht.[131] Sie fanden für MTX, Aminopterin, Methyl-4-amino-4-deoxy-10-methylpteroat (der Methylester der Verbindung 6f), TMP sowie 7,8-Dihydromethotrexat einen slow-tight-binding-Mechanismus (Abb. 1, Abb. 10), für 1-Deaza-methotrexat und 1-Deaza-4-amino-4-deoxypteroat (1-Deaza-Verbindung eines N10-Derivates von 6e) einen slow-binding-Mechanismus.

Die beiden Inhibitortypen unterscheiden sich in ihren Geschwindigkeitskonstanten zweifach:
Zum einen bilden die slow-tight-binding-Inhibitoren bis zum Faktor 50 schneller den Primärkomplex EI zum anderen ist der Quotient k_5/k_6 höher als bei den slow-binding-Inhibitoren.

Unter Berücksichtigung der hohen Homologie zwischen bakteriellen Dihydrofolat-Reduktasen von Lactobacillus casei und Streptococcus faecium, kann das obige Ergebnis zu einer

plausiblen Erklärung der von mir erhaltenen Resultate herangezogen werden.

Die Verbindungen MTX, 6f, DCMTX, die mit den von Williams beschriebenen Verbindungen (MTX, Methylester der Verbindung 6e und 6f, Aminopterin) identisch oder denen zumindest sehr ähnlich sind, bilden mit den Liganden, die in Abb. 20 und 21 entlang der ausgezogenen Gerade angeordnet sind, eine Gruppe von slow-tight-binding-Inhibitoren. Die 1-Deazaverbindungen von MTX und dem N10-Derivat von 6e fallen nach den Untersuchungen von Williams et.al. um den Faktor 200-4000 in ihrer Gesamtdissoziationskonstanten von den slow-tight-binding-Inhibitoren ab und bilden die Gruppe der slow-binding-Inhibitoren.[131] Das gleiche gilt hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirksamkeit für die am Pteridinring an Position 7 oder 8 substituierten Liganden (Abb. 10). In Analogie zu der Einteilung von Williams bilden entsprechende Verbindungen der von uns untersuchten Derivate, nämlich 7a, 7d, 7-MeMTX und 7-MeDCMTX eine Gruppe (Abb. 20, 21), die in Abb. 20. bzw. 21 durch einen gepunkteten Kasten bzw. eine Gerade gekennzeichnet ist. Es stellt sich natürlich die Frage, warum im WW-Modell A die Verbindungen 6a und 6b keinem der beiden Inhibitortypen zugeordnet werden können, und warum die Beziehung zwischen WWE und pI_{50}-Werten für die slow-binding-Inhibitoren nicht so gut ist wie im WW-Modell B (Abb. 20).

Die Antwort ist wohl in der Nichtberücksichtigung von Ladungen im ersten Modell und damit auch in einer fragwürdigen Orientierung der R1-Substituenten zu suchen. So kann daher das bessere Ergebnis mit Modell B in der Weise interpretiert werden, daß in der Realität Ladungen im aktiven Zentrum der DHFR auftauchen, wie es auch aufgrund der experimentellen Ergebnisse gefordert wird.[99-104]
Die Ausbidlung von H-Brücken erweist sich zwar nach

CNDO/2-Berechnungen als stabil, trägt aber der Wirklichkeit offensichtlich kaum Rechnung. Vielmehr scheint es so zu sein, daß sich die αund γCarboxylgruppen, wie im Bereich Pteridin -Asparaginsäure, als Anionen gegenüber den positiv geladenen Bindungsstellen Arg 31 und Arg 57 positionieren, die unpolaren R1-Substituenten sich aber von dem polaren positiv geladenen Zentrum ab- und hydrophoberen Bindungsstellen an der Öffnung des aktiven Zentrums zudrehen (Modell B).

In den hier vorgenommenen Untersuchungen wird nicht zwischen EI- und EI^+-Zuständen oder Komplexen unterschieden, und bei den eingesetzten pI_{50}-Werten wird nur das gesamtinhibitorische Verhalten erfaßt. Die vorgestellten Modelle, geliefert durch die Geometrie der Röntgenstruktur, geben einen Zustand wieder, von dem nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob es ein EI- oder EI^+-Zustand ist, oder ein durch die Kristallstruktur gelieferter dritter Zustand. In einer persönlichen Mittelug äußert J.F. Morrison die Vermutung, daß es sich bei der vorliegenden Kristallstruktur um einen EI^+-Komplex handelt.[135] Diese Auffassung kann aus Betrachtungen von Gronenborn et.al.[126] und den Untersuchungen von Williams et.al. abgeleitet werden.[131] Nach spektroskopischen Untersuchungen existiert der DHFR-NADP-MTX-Komplex fast ausschließlich in einer einzigen Konformation, wohingegen der DHFR-NADP-TMP-Komplex zu gleichen Teilen in zwei verschiedenen Konformationen vorkommt.[126] Nun hat Williams aus kinetischen Untersuchungen nachgewiesen, daß MTX den stabilsten EI^+-Komplex bildet und TMP den stabilsten EI- und einen weniger starken EI^+-Komplex.[131] Diese Resultate auf die Kristallstruktur übertragen, lassen durchaus die Vermutung zu, es handele sich bei dem vorliegenden MTX-NADPH-DHFR-Komplex um den EI^+-Zustand.

Wenn dem aber so ist, dann müßten aufgrund der berechneten WWE die Verbindungen 7a und 7d stabilere EI^+-Komplexe bilden als die Verbindungen 6a und 6d und die Verbindungen 7-MeMTX sowie 7-MeDCMTX stabilere als die Substanzen MTX und DCMTX (Abb. 20, 21). Dies steht aber eindeutig im Widerspruch zu den experimentellen Befunden von Williams et.al. sowie den Einteilungskriterien für die beiden besprochenen Hemmtypen.[131]

Dieses Resultat steht wahrscheinlich mit der Carboxylgruppe von Asp 26 und dem Ladungsstatus des Pteridinringes beim Binden der Substanzen 7a, 7d, 7-MeMTX, 7-MeDCMTX in Zusammenhang.

Röntgenographische Untersuchungen an der DHFR aus Hühnerleber von Volz et.al., einmal mit und ohne Inhibitor, zeigen, daß beim Binden des Liganden Glu 30 (Asp 26 ist dieser Bindungsstelle in der DHFR von L.casei analog) Bewegungen in der Seitenkette von über 3Å unterworfen ist.[25] Durch diese Beweglichkeit in der Seitenkette findet also eine genaue Ausrichtung der Carboxylgruppe gegenüber dem N1 des Pteridinringes und der 2-Aminofunktion statt.

Nun lassen sich für die slow-binding-Inhibitoren tatsächlich Punkte finden, die ihren Ladungsstatus und die Beweglichkeit der Asp-Seitenkette beeinflussen können.

Damit der Einbau der 7-Methylverbindungen in das aktive Zentrum erfolgen konnte, mußten Drehungen an der Nachbaraminosäure von Asp 26, Leu 27 und der Bindungsstelle Leu 19 vorgenommen werden. Diese Drehungen können durchaus Einfluß auf die Beweglichkeit der Carboxylgruppe und damit auf den Ladungsstatus des Pteridinringes der 7-Methylderivate haben.

Für die N-Oxid-Verbindungen lassen sich folgende Punkte anführen:

Nach den CNDO/2-Berechnungen ist eine Protonierung der N-Oxid-Verbindungen im Komplex mit Ameisensäure um 17 Kcal ungünstiger als die der unsubstituierten R2-Derivate. Dies

bedeutet eine deutliche Abstufung der Protonenaffinität. Zum anderen kann beim Binden der N-Oxid-Verbindungen Wasser 253 (Abb. 12), das eine H-Brücke zur Carboxylgruppe von Asp 26 ausbildet und an der Bildung einer Wasserbrücke vom aktiven Zentrum zum Lösungsmittelwasser beteiligt ist, seine durch die Kristallstruktur vorgegebene Position nicht mehr einnehmen, da der Raum vom Sauerstoff des N-Oxides beansprucht wird. Wie sich eine Wasserbrücke vom Inneren des aktiven Zentrums zum Lösungsmittelwasser hin, bzw. deren Störung auf den Ladungsstatus im Bereich Asp 26-Pteridinring auswirkt, ist natürlich schwierig zu sagen. Zumindest ist dieser Punkt auch im Zusammenhang mit der erschwerten Protonierung am N1 zu sehen.
Setzt man die Verbindungen 7a, 7d, 7-MeMTX und 7-MeDCMTX unprotoniert und die Carboxylgruppe von Asp 26 undissoziert in den WW-Komplex ein und berechnet die WWE, so nimmt diese um 10-12 Kcal ab. Damit bilden diese Liganden im Modell B instabilere Komplexe als die entsprechenden Substanzen ohne Methyl- oder Sauerstoffunktion, und nach dieser Korrektur kann dieses Modell zu einer plausiblen Erklärung aller experimentellen Befunde herangezogen werden. Die geäußerte Hypothese, daß die am Pteridinring substituierten Substanzen im Komplex unproportioniert sind, wird durch neue kalorimetrische Messungen an der DHFR aus Rinderleder bestätigt. Chauvet et.al. beobachteten für 7-Hydroxymethotrexat geringere elektrostatische Kräfte und eine andere Konformation des Enzyms als für MTX.[136] Diese Beobachtungen stimmen also mit den oben geäußerten Vermutungen genau überein. Im Modell A ist die Erklärung des Bindungsverhaltens für die Verbindungen 7a, 7d, 7-MeMTX und 7-MeDCMTX nicht möglich, da im Bereich der Asp 26 und des Pteridinringes nie Ladungen berücksichtigt sind.

Die Punkte, die bisher diskutiert wurden, zeigen deutlich, daß man nicht in jedem Fall davon ausgehen kann, daß ana-

loge Verbindungen den gleichen Bindungsmechanismus und die gleichen Bindungsgeometrie besitzen, wie die Muttersubstanz.
Dies bedeutet, daß zwei Ausgangsbedingungen dieser Arbeit nur eingeschränkte Gültigkeit besitzen.

- die Enzymkonformation ändert sich nicht, wenn Substanzen mit ähnlicher Struktur binden.
  Diese Annahme wird dadurch eingeschränkt, daß einige Bindungsstellen verändert werden mußten, damit alle Inhibitoren ins aktive Zentrum eingebaut werden konnten, ebenso wie durch die Vermutungen hinsichtlich des Ladungsstatus sowie der Orientierung der Asp-Seitenkette, wenn R2- und R3-substituierte Analoga von MTX binden.
- jede analoge Substanz bindet ähnlich der Muttersubstanz.
  Diese Annahme wird einmal eingeschränkt durch die Umorientierung des Pteridinringes von DHF gegenüber MTX[49,58] und zum anderen durch die unterschiedliche Orientierung der R1-Reste in Modell B gegenüber dem polaren Zentrum Arg 31 und Arg 57.

Es kann damit jeweils nur für bestimmte Gruppen von strukturanalogen Verbindungen davon ausgegangen werden, ihr pharmakologischer Effekt könne mit Hilfe der berechneten WWE direkt wiedergegeben werden. Dies gilt im untersuchten Fall für die R1- und R4-substituierten Verbindungen sowie für die R2- und R3-substituierten Verbindungen. Diese beiden Gruppen von strukturanalogen Verbindungen können jeweils durchgängig im WW-Modell B erklärt werden, wobei in jeder Gruppe eine der obigen Annahmen ihre Gültigkeit in verallgemeinerter Form einbüßt.

Auf einen Punkt soll in diesem Zusammenhang noch näher eingegangen werden, und zwar ist dies die Frage der Entropie. Nach Webb gibt es bei der Protein-Ligand-Wechselwirkung drei Punkte, die zu einer Änderung der Entropie führen:[122]

- die Starrheit, die in den Molekülen erzeugt wird bei der Bildung eines EI-Komplexes, die zu einem negativen ΔS führt.
- strukturelle Veränderungen im Enzym oder dem Substrat in Folge der Bindung, die sowohl zu einem positiven als auch negativen ΔS führen können.
- die Freisetzung von Wassermolekülen, mit einer Vergrößerung ihrer Rotationsfreiheit, resultierend in einem positiven ΔS-Wert.

Diese drei Punkte sind nicht bei der Berechnung der WWE und deren Korrelation mit pharmakologischen Daten berücksichtigt. Es ist aber klar, daß es nur dann eine Korrelation zwischen inhibitorischem Verhalten und der WWE geben kann, wenn für diese strukturanalogen Verbindungen der Entropiewert ungefähr gleich ist.
Dies scheint für die Gruppe der slow-binding- und die Gruppe der slow-tight-binding-Inhibitoren zuzutreffen.

Bei der Betrachtung der Energieterme, die die Gesamtenergie zwischen Ligand und Bindungsstelle ergeben, fällt auf, daß der Hauptenergiebeitrag durch den $E_{nonbond}$-Term geliefert wird (Tab. 9, Tab. 10). Die elektrostatische Energie liefert nur geringe Beiträge zur WWE. Bei ungeladenen Molekülen sind es maximal 20%. Anders wird die Situation natürlich bei geladenen Molekülen. Bei geladenen Komplexen kann der Beitrag der elektrostatischen Energie auf 70% anwachsen (Tab. 10). Der H-bond Term liefert Beträge von 1 bis 5 Kcal. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen von Gardüno et.al.[120] Insgesamt liegen die Wechselwirkungsenergien höher als die von Simon berechneten. Dies liegt daran, daß die Abstände zwischen Ligand und Bindungsstelle kürzer sind und zudem der Ligand größer ist.[74]

Ziel der Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen pI_{50}-Werten und den Wechselwirkungsenergien von 12 Inhibitoren

zu untersuchen. Es muß festgestellt werden, daß kein einheitlicher Zusammenhang für alle Inhibitoren zwischen inhibitorischer Wirksamkeit und WWE zu finden ist, wie in den Untersuchungen von Simon.[74] Vielmehr treten in den beiden Modellen zwei Gruppen von Inhibitoren auf, die sich in der Kinetik und Dynamik des Bindens unterscheiden müssen. Aufgrund der Betrachtungen der Inhibitoren im aktiven Zentrum sowie der Berechnung der WWE im Vergleich zur inhibitorischen Wirksamkeit lassen sich weitere Vorstellungen über das unterschiedliche Verhalten der slow- und slow-tight-binding-Inhibitoren ableiten.

Tab. 9 Die Wechselwirkungsanteile für die 20 Bindungsstellen zu MTX in Kcal. (Modell A)

Bindungsstellen	E_{el}	$E_{nonbond}$	$E_{H\text{-}bond}$	E_{tot}
Leu 4	-1.09	-4.71	-1.83	-7.63
Pep 5,6	+0.01	-8.97		-8.96
Leu 19	+0.05	-7.90		-7.85
Pro 24	+0.02	-0.71		-0.69
Asp 26	-2.01	-8.01	-2.25	-12.87
Leu 27	-1.03	-8.26		-9.29
His 28	-1.43	-3.97	-3.97	-9.37
Tyr 29	-0.09	-0.99		-1.08
Phe 30	+0.06	-15.02		-14.96
Arg 31	-1.87	-4.86		-6.73
Thr 45	-0.05	-1.50		-1.55
Ser 48	+0.16	-4.03		-3.87
Phe 49	-0.06	-7.07		-7.13
Pro 50	-0.45	-5.40		-5.85
Leu 54	-0.12	-4.98		-5.10
Pro 55	+0.29	-0.41		-0.12
Arg 57	-2.23	-1.26	-4.99	-8.48
Pep 97,98	-0.06	-5.69		-5.75
Thr 116	-0.01	-2.59		-2.60
Nicotinamid	-0.38	-8.45		-8.83

Tab. 10 Die Wechselwirkungsanteile für die 20 Bindungsstellen zu MTX in Kcal. (Modell B)

Bindungsstellen	E_{el}	$E_{nonbond}$	$E_{H\text{-}bond}$	E_{tot}
Leu 4	-0.66	-4.85	-1.83	-7.34
Pep 5,6	+0.11	-9.08		-8.97
Leu 19	+0.03	-7.92		-7.89
Pro 24	+0.14	-0.56		-0.42
Asp 26	-10.75	-1.22	-3.71	-15.68
Leu 27	+0.12	-9.57		-9.45
His 28	-2.72	-2.84	-3.97	-9.53
Tyr 29	-0.07	-0.99		-1.06
Phe 30	+0.05	-14.66		-14.61
Arg 31	-2.19	-6.56		-8.75
Thr 45	-0.00	-1.51		-1.51
Ser 48	+0.06	-4.02		-3.96
Phe 49	-0.03	-7.07		-7.10
Pro 50	-0.09	-5.38		-5.47
Leu 54	-0.09	-4.84		-4.93
Pro 55	+0.07	-0.36		-0.29
Arg 57	-7.79	-1.17	-5.46	-14.42
Pep 97,98	-0.55	-4.60		-5.15
Thr 116	+0.14	-2.63		-2.49
Nicotinamid	-0.42	-9.34		-9.76

Wenn auch die Anwendbarkeit der hier vorgestellten Verfahren aufgrund der eingeschränkten Gültigkeit der Randbedingungen zur Simulierung pharmakologischer Effekte strukturanaloger Verbindungen etwas differenzierter betrachtet werden muß, als ausgangs angenommen, so sind diese Methoden zusammen mit experimentellen Beobachtungen sicherlich nütz-

lich, um genauere Vorstellungen von Rezeptor-Pharmakon-Wechselwirkungen zu entwickeln.
Unter diesem Gesichtspunkt wäre es sicherlich interessant, am C2-Atom ^{13}C markierte Inhibitoren der Verbindungen 7a, 7d sowie des 7-Methylderivates von MTX dahingehend zu untersuchen, ob eine Protonierung am N1 dieser Substanzen im aktiven Zentrum der DHFR stattfindet (Abb. 1, Abb. 10). Zum anderen könnten WWE berechnet werden für Inhibitoren, deren genaue Dissoziationskonstanten für den EI- und EI^+-Zustand bekannt sind. Wenn die vorliegende Kristallstruktur den EI^+-Zustand wiedergibt, dürfte sich eine gute Korrelation der WWE nur mit den Dissoziationskonstanten für den EI^+-Zustand ergeben und nicht mit den Dissoziationskonstanten für den EI-Komplex, weil letzterer Zustand nicht durch die Kristallstruktur wiedergegeben würde.

E ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind die Wechselwirkungsenergien von 12 Methotrexat analogen Inhibitoren mit dem aktiven Zentrum der Dihydrofolat-Reduktase von L.c., simuliert durch 20 Bindungsstellen, berechnet worden.
Die Geometrie des Wechselwirkungskomplexes wird durch die optimierte Röntgenstruktur des DHFR-NADPH-MTX-Komplexes festgelegt. Das aktive Zentrum ist mit 20 Bindungsstellen simuliert, die teils bereits in der Literatur angegeben worden sind, teils über Abstandsmessungen und Betrachtung von Stereozeichnungen mit in die Untersuchung einbezogen wurden.
Alle Inhibitoren sind in ihren strukturanalogen Bereichen ebenso in das aktive Zentrum eingebaut wie Methotrexat.
Es sind zwei Wechselwirkungsmodelle berücksichtigt. Eines unter weitgehendem Ausschluß von Ladungen und ein zweites unter Berücksichtigung von Ladungen zwischen Liganden und Bindungsstellen.
Die Ladungsverteilung der einzelnen Bindungsstellen und der Inhibitoren wurde mit dem CNDO/2-Verfahren berechnet. Zur Berechnung der Wechselwirkungsenergie diente eine rein empirische Formel, die gut zur Beschreibung von H-Brückensystemen geeignet ist.
Bei der Korrelation zwischen WWE und experimentell bestimmten Inhibitorraten ergibt sich in beiden Modellen eine Einteilung der Liganden in zwei Gruppen.
Es erfolgt eine Trennung der Substanzen in slow- und slow-tight-binding-Inhibitoren. Die Zuordnung der Verbindungen zu diesen beiden Gruppen ist nur im zweiten WW-Modell, also unter Berücksichtigung von Ladungen im Protein-Ligand-Komplex, wie es auch durch experimentelle Befunde nahegelegt wird, eindeutig. Im ersten WW-Modell, das weitgehend ohne geladene Bindungsstellen aufgebaut wurde, können 2 der 12 Liganden keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden.

F EIN WECHSELWIRKUNGSMODELL MIT DREI BINDUNGSSTELLEN

Wie bereits erwähnt, beschäftigt sich Höltje mit der Erstellung von einfachen Rezeptormodellen für strukturanaloge Pharmaka.[66-71]
Der pharmakologische Effekt soll dabei nur von wenigen Aminosäuren abhängen, die in der Hauptsache den Rezeptor charakterisieren.
Nun bieten sich im Wechselwirkungsmodell A drei Strukturen bzw. markante Bindungsstellen an, die nahe bei oder direkt gegenüber strukturvariierten Bereichen von 8 der 12 Inhibitoren liegen (Abb. 11, Abb. 12). Im Bereich der R2- und R3-Substituenten liegt Asp 26, eine wichtige Bindungsstelle für den Pteridinring. Für die R1-Substituenten der Verbindungen MTX, 7-MeMTX, 6a, 6b, 6c, 7a sind die Aminosäuren Arg 31, Arg 57 und His 28 wesentlich (Abb. 12, Abb. 16). Für die R4-Derivate läßt sich keine markante Bindungsstelle ausmachen. Ebenso ist ein charakteristischer Einfluß der Bindungsstellen His 28, Arg 31 und Arg 57 auf die Verbindungen 6e und 6f nicht zu erwarten. Der R1-Rest der Substanzen 6d und 7d ist hingegen so raumerfüllend, daß ein solcher spezifischer Einfluß der obengenannten Bindungsstellen wieder möglich erscheint (Abb. 10, Abb. 11).
Wenn es nun möglich ist, das pharmakologische Verhalten von Verbindungen durch wenige Aminosäuren zu beschreiben, müßte der Zusammenhang zwischen WWE und inhibitorischem Verhalten in einem WW-Modell mit drei Bindungsstellen ähnlich sein wie in Modell A. Für das WW-Modell B gilt diese Annahme natürlich nicht, da einige R1-Substituenten von den Aminosäuren His 28, Arg 31 und Arg 57 abgedreht sind.
Zur Berechnung der WWE in diesem reduzierten Modell wurde das CNDO/2-Verfahren eingesetzt.[105-107]
Dabei sind in den Wechselwirkungskomplexen mit den Bindunsstellen nur die sich ändernden Atomgruppen der MTX-Analoga berücksichtigt. Die Aminosäuren Arg 31 und Arg 57 sind zu

einer Bindungsstelle zusammengefaßt und durch Methylguanidine simuliert. Durch welche Molekülgruppen die einzelnen Inhibitoren simuliert sind, zeigt Tab. 11. Die Konformation aller Atomgruppen ist identisch mit der im WW-Modell A (d.h. die Essigsäure-, Ethanol-, Ethylacetatmoleküle sind so ausgerichtet, daß eine H-Brückenbildung zu den Bindungsstellen möglich ist). Das gleiche gilt für die Pteridin-Asp-Komplexe.

Tab. 11 Strukturen für das Dreibindungsstellen-Modell

Verbindung \ Bindungsstelle	Asp 26	His 28	Arg 31,57
MTX	2,4-Diamino-pteridin	Essigsäure	Essigsäure
7-MeMTX	2,4-Diamino-7-methylpteridin	Essigsäure	Essigsäure
6a	2,4-Diamino-pteridin	Ethylacetat	Etylacetat
6b	2,4-Diamino-pteridin	Ethanol	Etanol
6c	2,4-Diamino-pteridin	Ethan	Ethan
6d	2,4-Diamino-pteridin	Propan	Ethan
7a	2,4-Diamino-8-oxidopteridin	Ethylacetat	Ethylacetat
7d	2,4-Diamino-8-oxidopteridin	Propan	Ethan

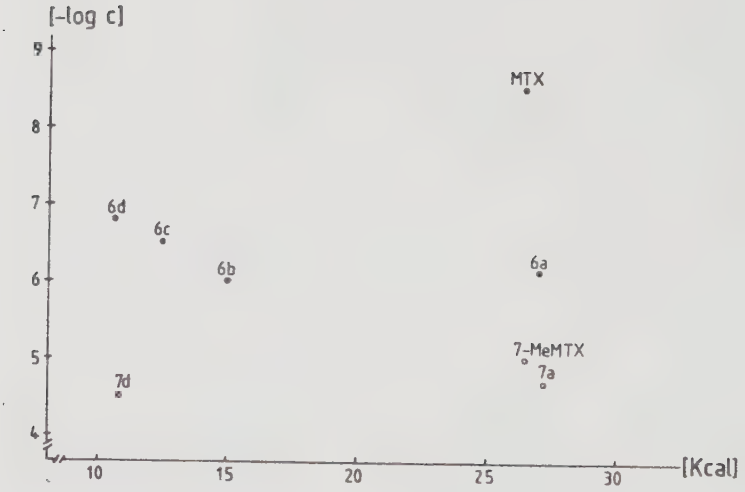


Abb. 23 Graphische Darstellung des Zusammenhanges zwischen experimentell ermittelten pI_{50}-Werten und berechneter WWE im reduzierten Modell mit nur 3 Bindungsstellen. Die WW-Komplexe sind in der gleichen Geometrie eingesetzt wie in Modell A (vgl. Abb. 20).

Tab. 12 Die Wechselwirkungsenergien zwischen einigen MTX-Derivaten und dem Substrat, simuliert mit drei Bindungsstellen.

Verbindung	Asp 26	His 28	Metgua. 31,57	$E_{(tot.)}$(kcal.)
MTX	-10.60	- 8.04	- 7.76	-26.40
7-MeMTX	-10.73	- 8.04	- 7.76	-26.53
6a	-10.60	- 8.34	- 8.04	-26.98
6b	-10.60	- 1.77	- 2.61	-14.98
6c	-10.60	- 0.46	- 1.34	-12.40
6d	-10.60	- 0.03	- 0.02	-10.65
7a	-10.83	- 8.34	- 8.04	-27.21
7d	-10.83	- 0.03	- 0.02	-10.88

Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tab. 12 dargestellt. Abb. 23 zeigt die graphische Darstellung des Zusammenhanges zwischen WWE und den experimentell ermittelten pI_{50}-Werten. Beim Vergleich der Abb. 23 mit Abb. 20 fällt auf, daß die erhaltenen Ergebnisse qualitativ ähnlich sind.
Dies gilt besonders für die Verbindungen MTX, 6b, 6c, 6d, 7-MeMTX. Die N-Oxid-Verbindungen 7a, 7d liegen in den graphischen Darstellungen etwas unterschiedlich. Dies läßt den Schluß zu, daß ihre Charakterisierung mit Hilfe von Asp 26 nicht hinreichend ist, wohingegen eine qualitative Abstufung der R1-Substituenten MTX, 6a, 6b, 6c, 6d mit dem einfachen Modell ähnlich der ist, wie sie aus Modell A resultiert. Um das inhibitorische Verhalten der N-Oxid-Verbindungen hinreichend zu beschreiben, wäre eine vierte Bindungsstelle im Bereich des Pteridinringes notwendig. Das Resultat kann durchaus so gedeutet werden, daß für streng strukturanaloge Verbindungen der pharmakologische Effekt durch ein sehr reduziertes Bindungsstellenmodell simuliert werden kann. Es kann als Bestätigung der Annahme gesehen

werden, die der Aufstellung von Rezeptormodellen nach den Vorstellungen von Höltje zu Grunde liegt.[66,68] Damit sind die Einschränkungen, die im Abschnitt D bezüglich Geometrieänderungen des Liganden und der Bindungsstellen erwähnt sind, natürlich nicht aufgehoben.

G ANHANG

G1 Abbildungen der Bindungsstellen und der Liganden

Die Liganden müssen aus den Teilen 1 bis 3 und den Teilen A bis H zusammengesetzt werden (Abb. 47 - 62).

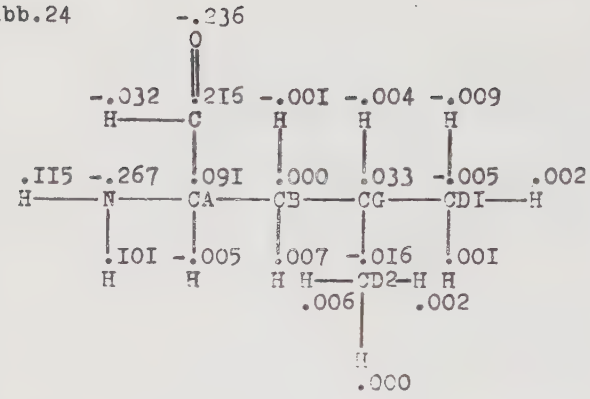
		Ligand
Teil 1	+ Teil A	MTX
	+ Teil B	6a
	+ Teil C	6b
	+ Teil D	6c
	+ Teil E	6d
	+ Teil F	6e
	+ Teil G	6f
	+ Teil H	DCMTX
Teil 2	+ Teil B	7a
	+ Teil E	7d
Teil 3	+ Teil A	7-MeMTX
	+ Teil H	7-MeDCMTX

G2 Tabellen (Tab. 13, Tab. 14)

G3 Programm zur Berechnung der Wechselwirkungsenergie

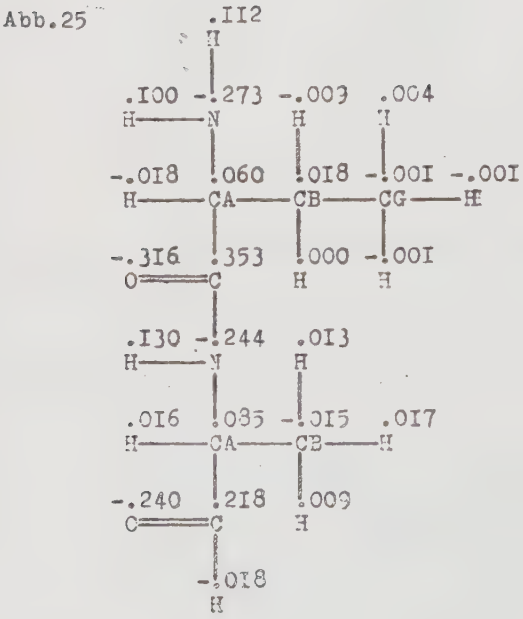
Die Rechnungen wurden durchgeführt auf der Rechenanlage Digital DEC 10 der Universität Frankfurt.

Abb.24



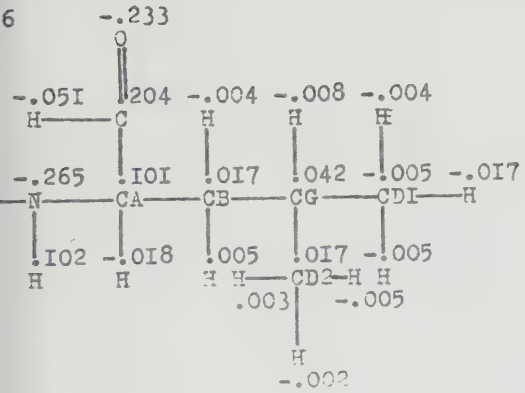
LEUCIN 4

Abb.25

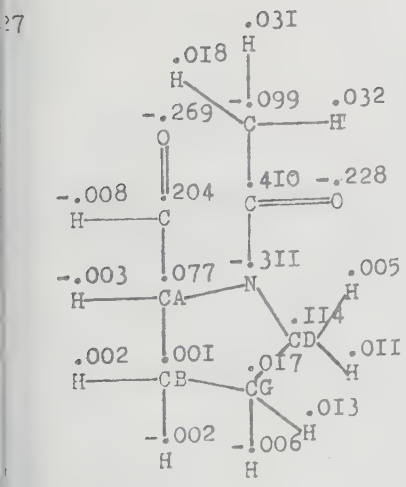


PEPTID 5,6

G1

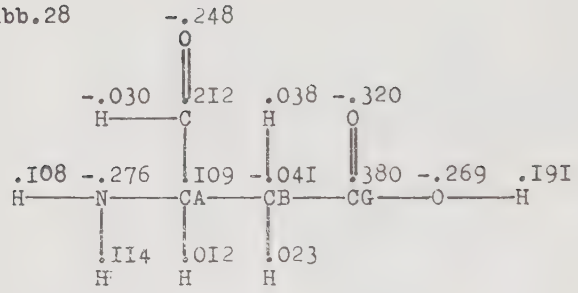


IN I9



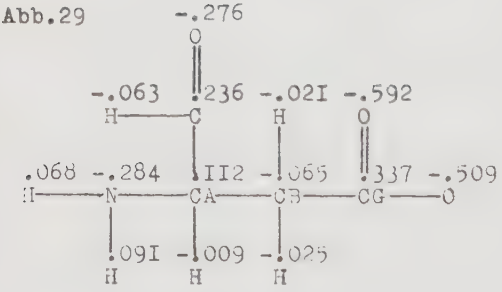
OLIN 24

Abb.28

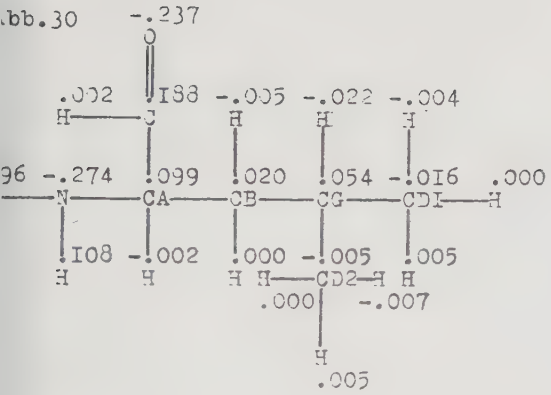


ASPARAGINSÄURE 26

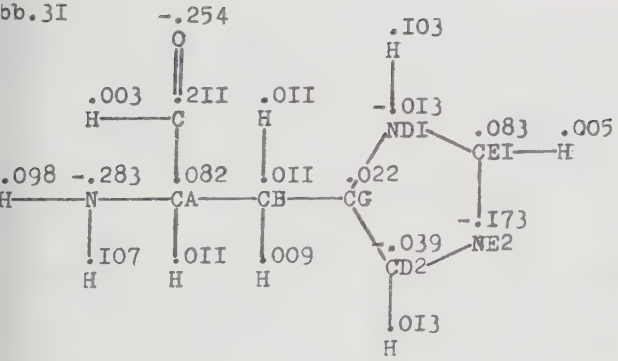
Abb.29



ASPARAGINSÄURE 26 (gelöst)

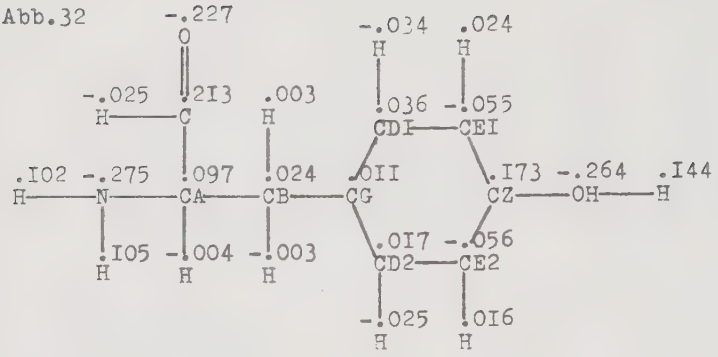


UCIN 27



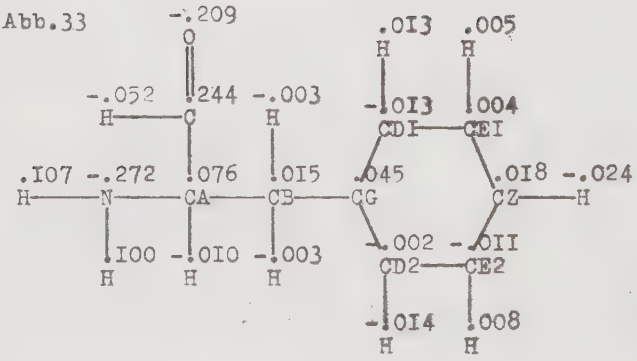
ISTIDIN 28

Abb.32



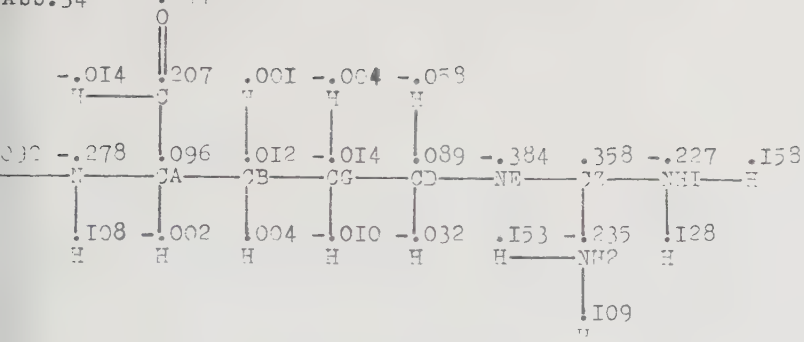
TYROSIN 29

Abb.33



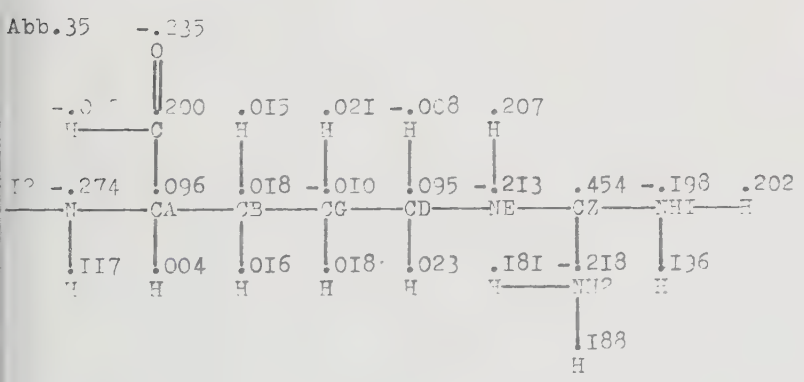
PHENYLALANIN 30

Abb.34



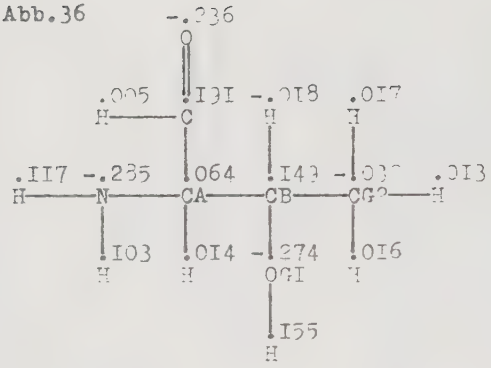
ARGININ 3I (ungeladen)

Abb.35



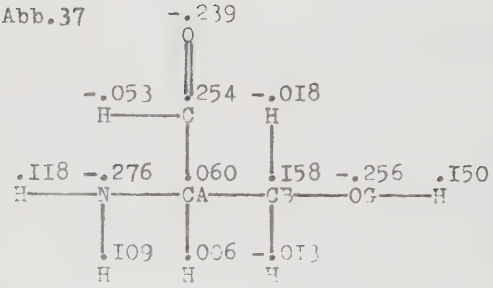
ARGININ 3I (protoniert)

Abb.36



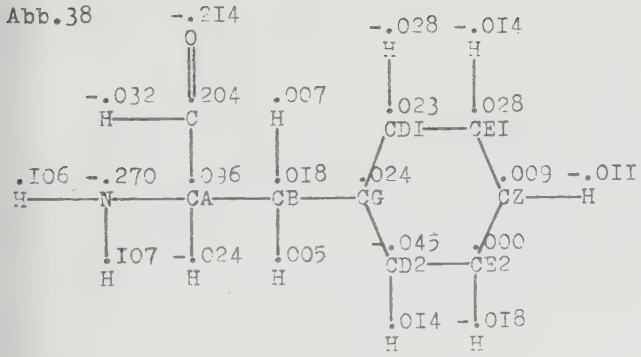
THREONIN 45

Abb.37



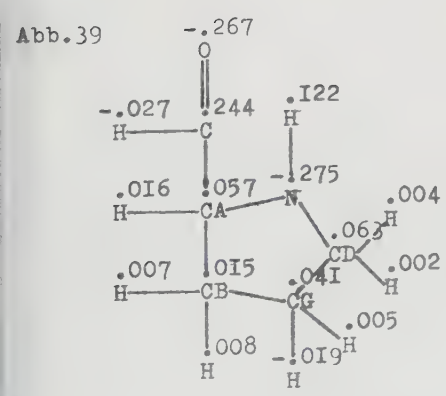
SERIN 48

Abb.38



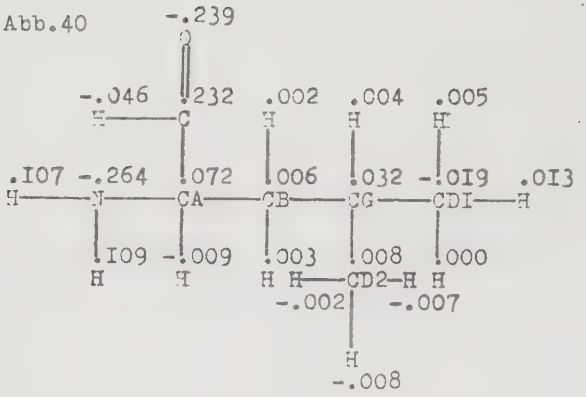
DHENYLALANIN 49

Abb.39



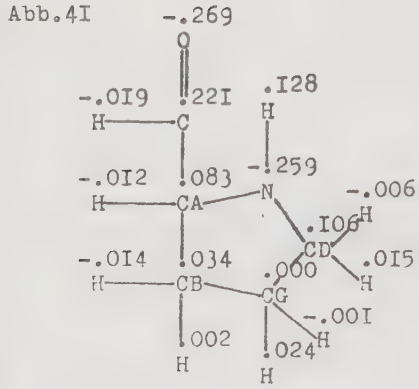
PROLIN 50

Abb.40



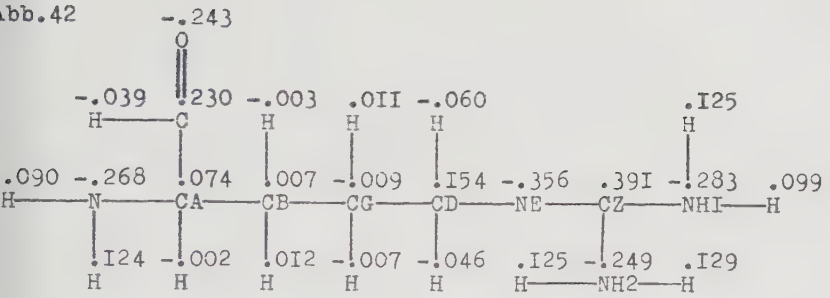
LEUCIN 54

Abb.4I



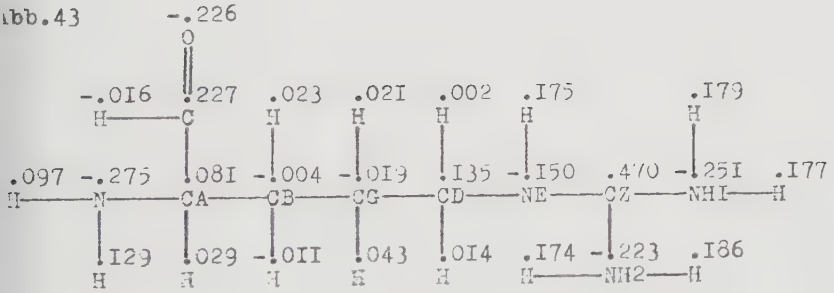
PROLIN 55

Abb.42



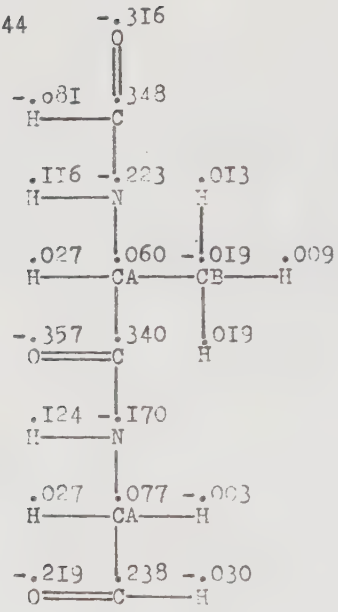
ARGININ 57

Abb.43



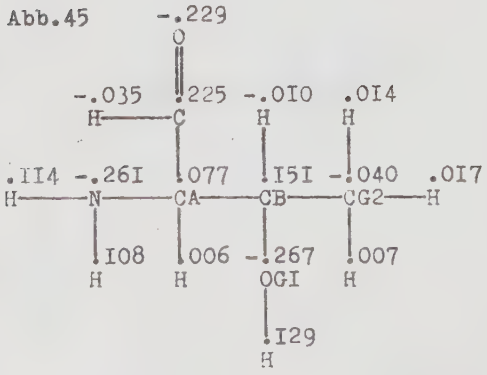
ARGININ 57 (protoniert)

Abb.44



PEPTID 97,98

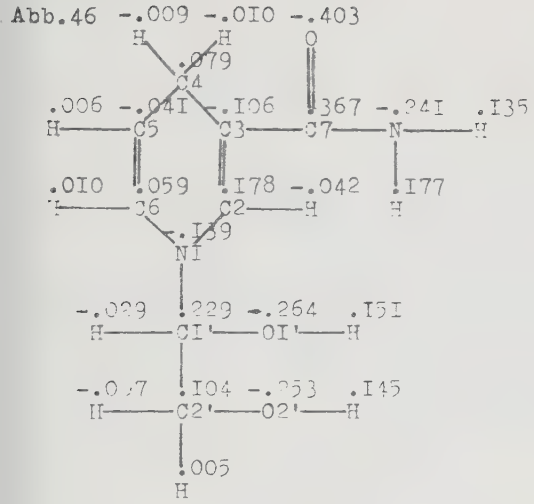
Abb.45



THREONIN 116

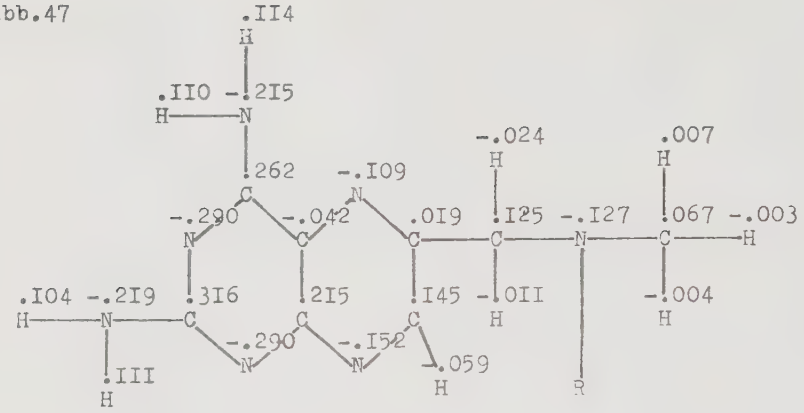
G1

Abb.46



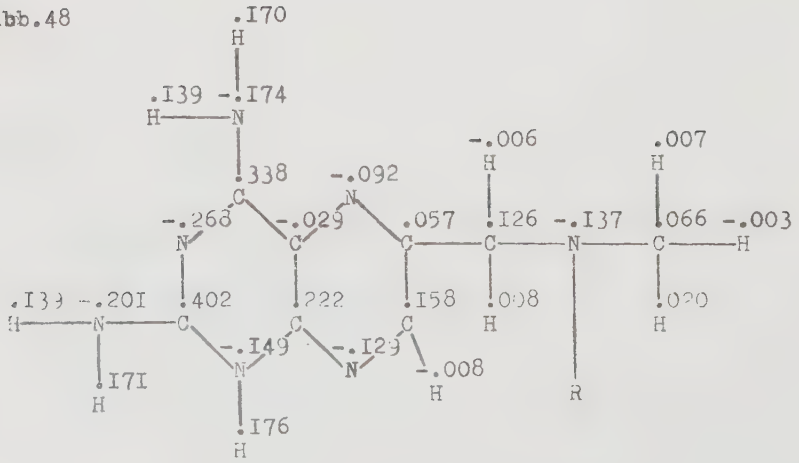
NICOTINAMID

Abb.47



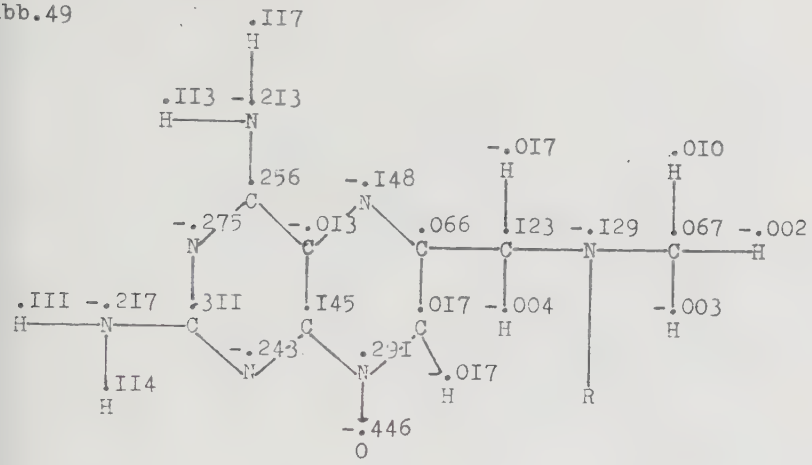
TEIL I

Abb.48



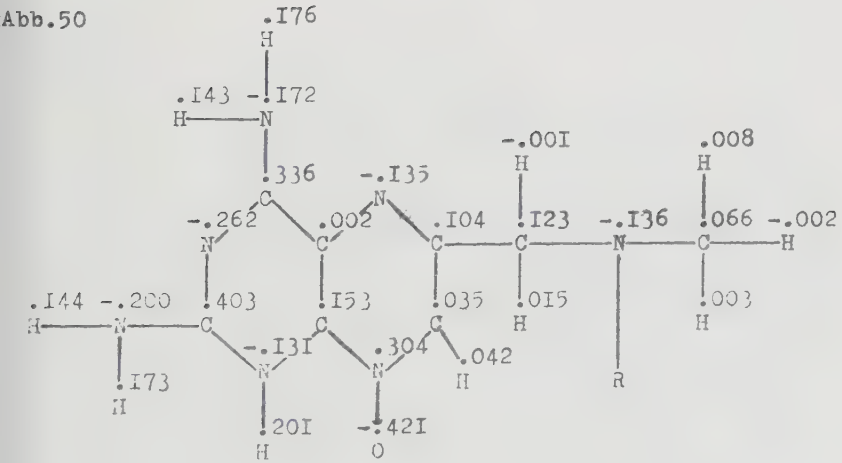
TEIL I (protoniert)

Abb.49



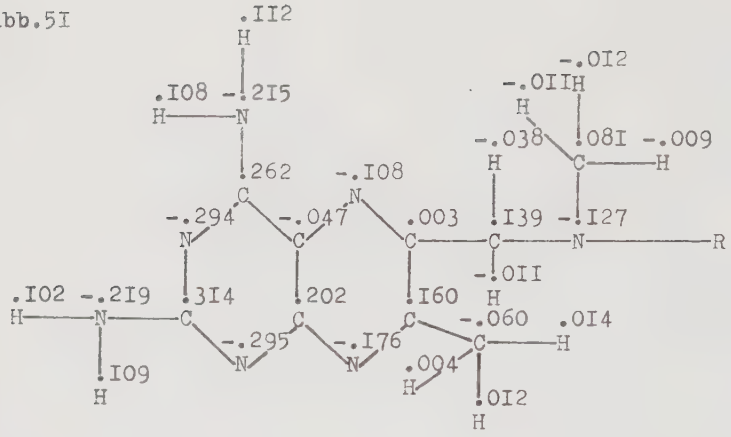
TEIL 2

Abb.50



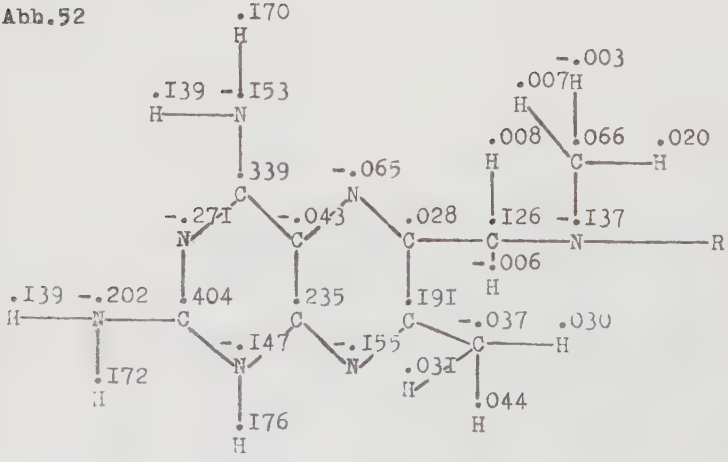
TEIL 2 (protoniert)

Abb.51



TEIL 3

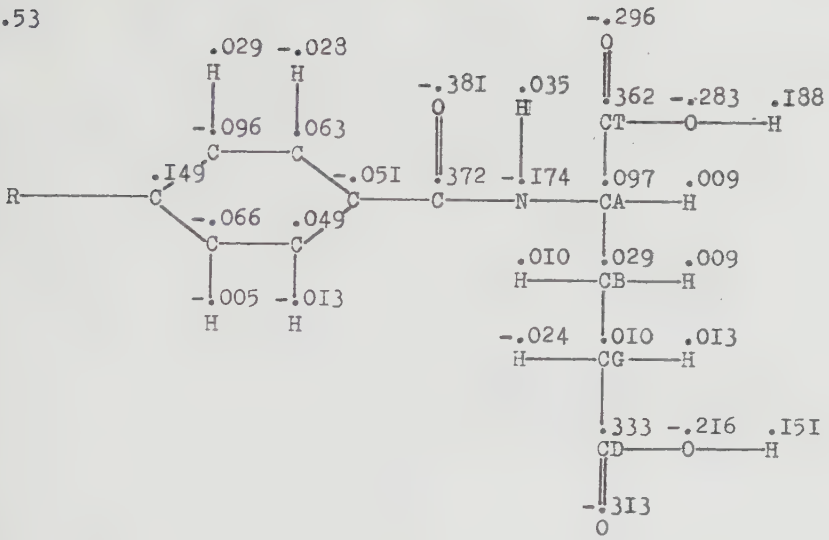
Abb.52



TEIL 3 (protoniert)

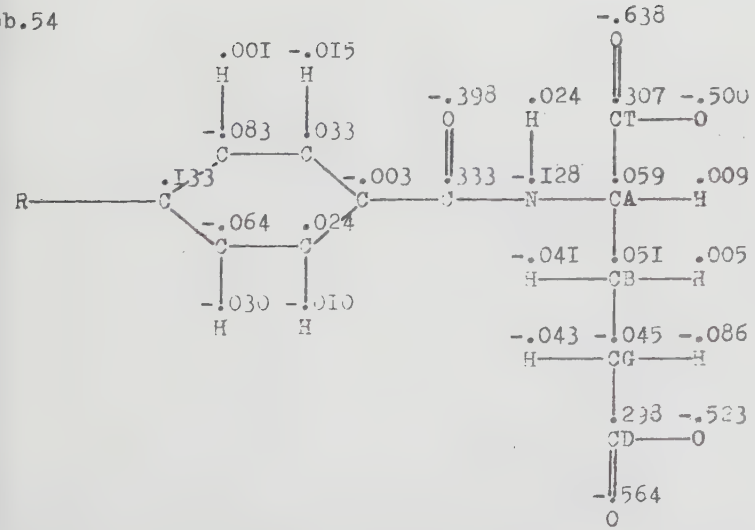
G1

Abb.53



TEIL A

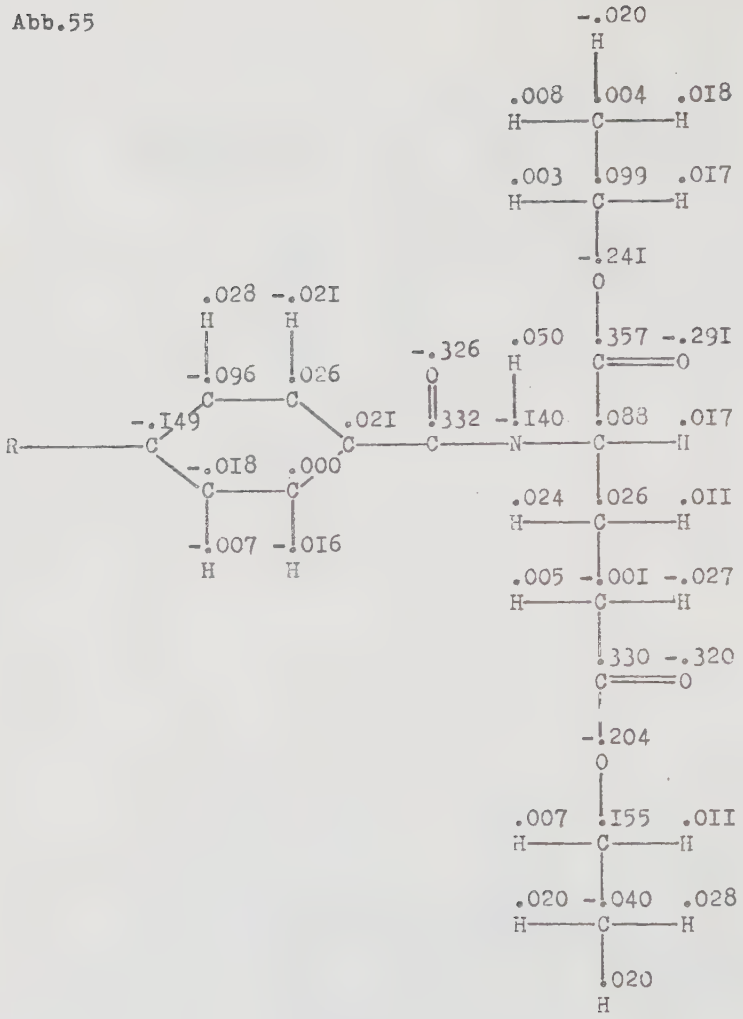
Abb.54



TEIL A (deprotoniert)

G1

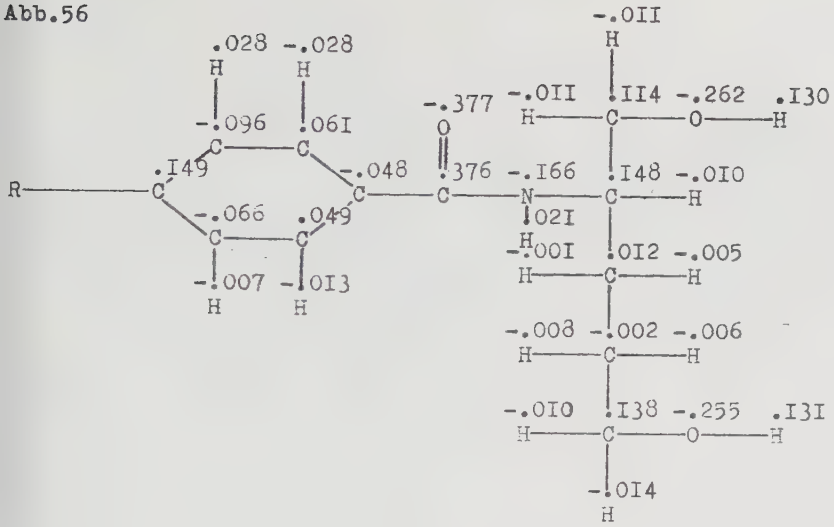
Abb.55



TEIL B

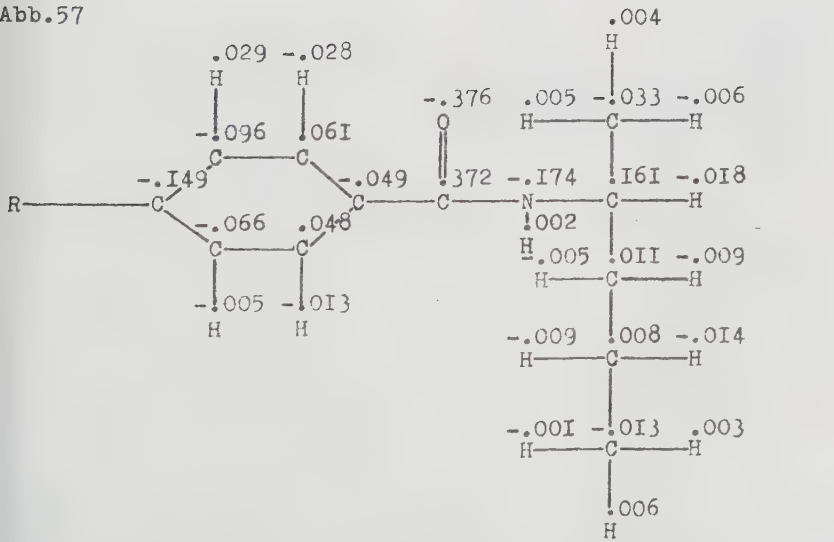
G1

Abb.56



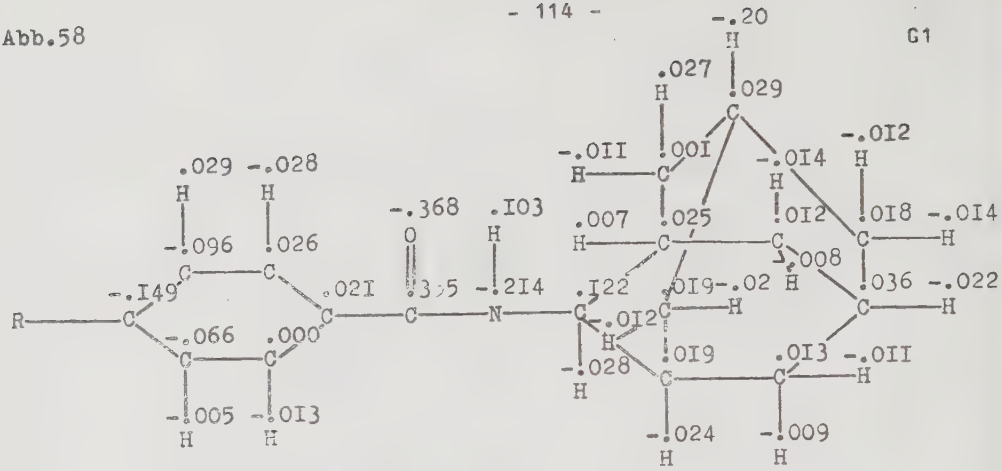
TEIL C

Abb.57



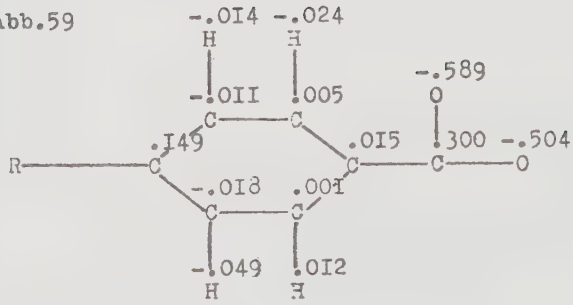
TEIL D

Abb.58



TEIL E

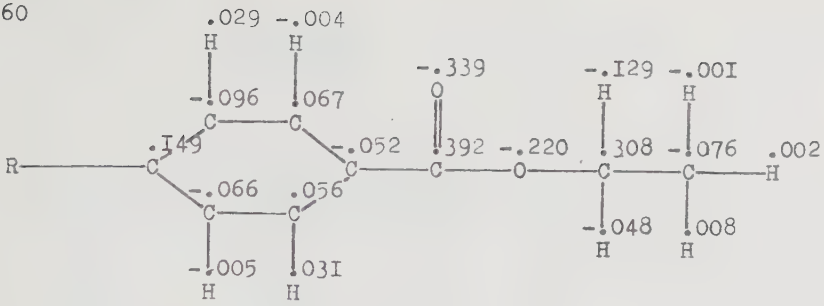
Abb.59



TEIL F

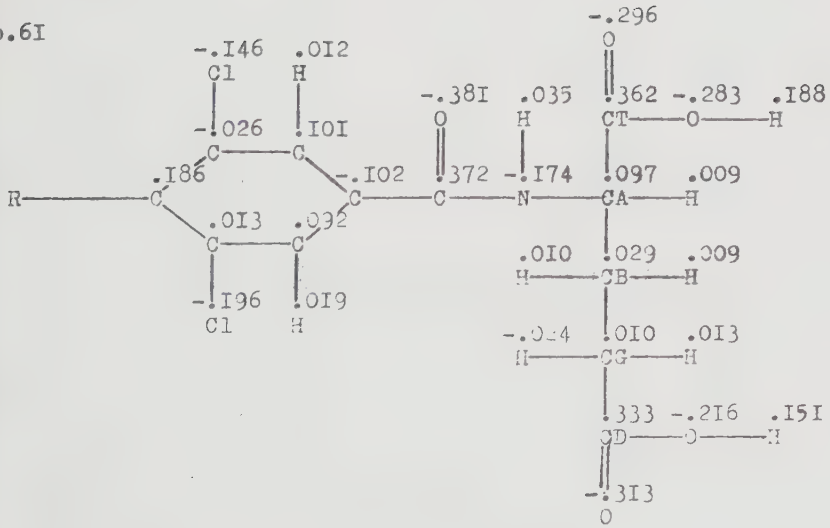
G1

Abb.60



TEIL G

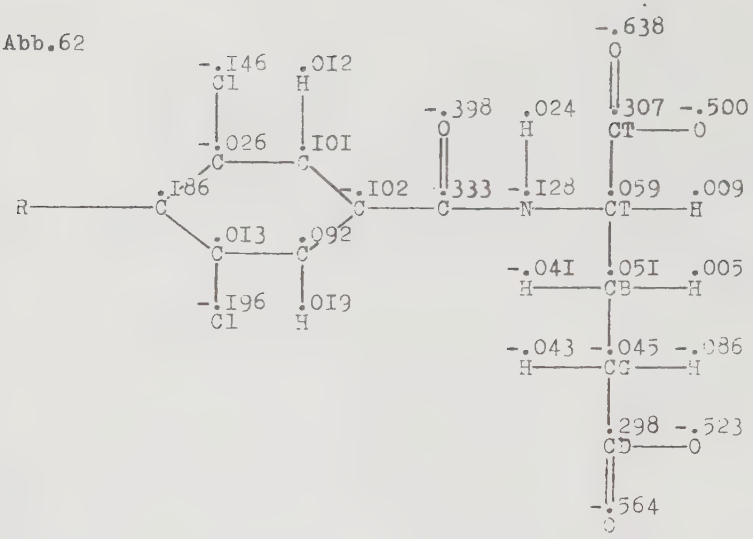
Abb.6I



TEIL H

G1

Abb.62



TEIL II (deprotoniert)

Tab. 13 Die Wechselwirkungsenergie zwischen Liganden und Bindungsstellen (Kcal)

	MTX	DCMTX	7-MeMTX	7-MeDCMTX	6a
Leu 4	- 7.63	- 7.54	- 7.56	- 7.47	- 7.65
Pep 5,6	- 8.96	- 9.04	- 9.06	- 9.15	- 8.94
Leu 19	- 7.85	- 8.40	-12.69	-13.07	- 7.83
Pro 24	- 0.69	- 0.72	- 0.67	- 0.71	- 0.41
Asp 26	-12.87	-12.87	-12.93	-12.93	-12.99
Leu 27	- 9.29	- 9.57	- 7.22	- 7.40	- 9.73
His 28	- 9.37	- 9.37	- 9.41	- 9.41	-11.00
Tyr 29	- 1.08	- 1.07	- 1.09	- 1.09	- 1.13
Phe 30	-14.96	-13.63	-15.17	-13.84	-15.15
Arg 31	- 6.73	- 6.74	- 6.73	- 6.75	-10.52
Thr 45	- 1.55	- 1.66	- 1.55	- 1.67	- 1.58
Ser 48	- 3.87	- 4.23	- 3.92	- 4.27	- 3.95
Phe 49	- 7.13	- 8.13	- 7.22	- 8.22	- 7.10
Pro 50	- 5.85	- 6.23	- 5.90	- 6.27	- 5.76
Leu 54	- 5.10	- 5.29	- 5.13	- 5.32	- 8.00
Pro 55	- 0.12	- 0.10	- 0.10	- 0.09	- 2.06
Arg 57	- 8.48	- 8.45	- 8.50	- 8.47	- 9.24
Pep 97,98	- 5.75	- 5.65	- 5.66	- 5.54	- 5.84
Thr 116	- 2.60	- 2.60	- 2.62	- 2.62	- 2.61
Nicotinamid	- 8.83	- 8.83	- 8.91	- 9.27	- 8.73
	-128.71	-130.12	-132.04	-133.56	-140.22

G2

6b	6c	6d	6e	6f	7a	7d
- 7.62	- 7.61	- 7.59	- 8.08	- 7.44	- 7.83	- 7.76
- 8.96	- 8.96	- 8.95	- 8.96	- 9.20	- 9.05	- 9.04
- 7.85	- 7.83	- 7.87	- 7.83	- 8.17	- 8.47	- 8.46
- 0.16	- 0.22	- 0.39	- 0.02*	+ 0.49*	- 0.27	- 0.28
-14.61	-13.10	-13.10	-12.94	-12.54	-14.71	-14.79
- 8.77	- 8.70	- 9.00	- 6.69	- 5.11	-12.21	-11.50
- 4.47	- 3.05	- 1.04	- 0.70*	- 1.07*	-11.17	- 1.19
- 1.11	- 1.07	- 0.98	- 1.00	- 1.28	- 1.27	- 1.11
-14,74	-14.73	-13.78	-13.49	-13.42	-15.39	-14.00
- 7.07	- 5.40	- 2.89	- 3.25*	-15.65*	-10.54	- 2.91
- 1.53	- 1.52	- 1.49	- 1.54	- 1.21	- 1.57	- 1.50
- 3.85	- 3.84	- 3.80	- 3.88	- 3.16	- 3.89	- 3.80
- 7.11	- 7.13	- 7.59	- 7.11	- 7.42	- 7.12	- 7.58
- 5.87	- 5.92	-11.28	- 5.86	- 6.26	- 5.80	-11.28
- 5.83	- 5.64	- 6.44	- 3.78	- 2.49*	- 8.05	- 6.43
- 0.36	- 0.31	- 0.69	- 0.11	+ 0.11	- 2.06	- 0.70
- 7.00	- 4.68	- 0.92	- 1.21	- 9.01*	-10.74	- 0.95
- 5.75	- 5.76	- 5.75	- 5.76	- 5.42*	- 5.92	- 5.97
- 2.61	- 2.61	- 2.61	- 2.60	- 2.59	- 2.60	- 2.60
- 8.89	- 8.90	- 8.93	- 8.86	- 9.69	- 9.39	- 9.50
-124.16	-116.98	-115.09	-103.67	-120.53	-148.05	-121.35

* kennzeichnet AMS, Dielektrizitätskonstante = 2.

G2

Tab. 14: Die Wechselwirkungsenergie zwischen Liganden und Bindungsstellen im geladenen WWE-Komplex (Kcal)

	MTX	DCMTX	7-MeMTX	7-MeDCMTX	6a
Leu 4	- 7.35	- 7.38	- 7.36	- 7.39	- 7.34
Pep 5,6	- 8.97	- 8.99	- 9.00	- 9.03	- 8.96
Leu 19	- 7.89	- 8.32	-12.69	-12.99	- 7.90
Pro 24	- 0.41	- 0.42	- 0.44	- 0.45	- 0.42
Asp 26	-15.68	-15.69	-15.83	-15.85	-16.30
Leu 27	- 9.44	- 8.32	- 7.42	- 7.60	- 8.36
His 28	- 9.53	- 9.53	- 9.54	- 9.56	- 0.43
Tyr 29	- 1.05	- 1.06	- 1.05	- 1.06	- 0.88
Phe 30	-14.60	-12.10	-14.71	-12.19	-12.62
Arg 31	- 8.75	- 8.77	- 8.72	- 8.76	- 0.66
Thr 45	- 1.51	- 1.65	- 1.54	- 1.66	- 1.52
Ser 48	- 3.96	- 4.51	- 4.00	- 4.55	- 4.02
Phe 49	- 7.10	- 8.10	- 7.17	- 8.17	- 7.23
Pro 50	- 5.48	- 5.90	- 5.49	- 5.95	-10.00
Leu 54	- 4.93	- 5.12	- 4.95	- 5.14	- 5.40
Pro 55	- 0.29	- 0.29	- 0.29	- 0.30	- 1.09
Arg 57	-14.42	-14.44	-16.65	-16.71	- 0.55
Pep 97,98	- 5.15	- 5.25	- 5.17	- 5.26	- 5.15
Thr 116	- 2.48	- 2.48	- 2.48	- 2.49	- 2.48
Nicotinamid	- 9.76	- 9.93	- 9.95	-10.10	- 9.76
	-138.75	-138.25	-144.45	-145.21	-111.07

G2

6b	6c	6d	6e	6f	7a	7d
- 7.34	- 7.34	- 7.34	- 7.33	- 7.33	- 7.82	- 7.83
- 8.96	- 8.96	- 8.96	- 8.96	- 8.95	- 9.06	- 9.06
- 7.89	- 7.88	- 7.89	- 7.87	- 7.88	- 8.46	- 8.45
- 0.29	- 0.29	- 0.36	- 0.17	- 0.24	- 0.41	- 0.35
-16.28	-16.28	-16.36	-15.99	-16.25	-16.73	-16.87
- 7.31	- 8.35	- 8.90	- 5.56	- 7.85	-10.73	-11.27
- 0.35	- 0.38	- 1.02	- 0.24	- 0.29	- 0.46	- 1.05
- 0.88	- 0.88	- 0.93	- 0.87	- 0.87	- 0.88	- 0.93
-12,60	-12.61	-13.32	-12.56	-12.62	-12.76	-13.46
- 0.76	- 1.10	- 2.64	- 0.64	- 0.39	- 0.87	- 2.83
- 1.52	- 1.52	- 1.52	- 1.51	- 1.52	- 1.52	- 1.52
- 4.01	- 4.00	- 4.01	- 3.95	- 3.99	- 4.03	- 4.03
- 7.16	- 7.11	- 7.37	- 6.98	- 7.13	- 7.24	- 7.38
-11.14	- 9.11	-10.69	- 5.28	- 8.15	-10.02	-10.70
- 3.69	- 3.66	- 6.39	- 2.60	- 3.19	- 5.40	- 6.40
- 0.56	- 0.42	- 0.61	- 0.06	- 0.10	- 1.08	- 0.61
- 0.40	- 0.45	- 0.78	- 0.69	- 0.24	- 0.81	- 1.02
- 5.15	- 5.15	- 5.16	- 5.14	- 5.15	- 4.90	- 4.91
- 2.48	- 2.48	- 2.48	- 2.47	- 2.48	- 2.55	- 2.55
- 9.75	- 9.75	- 9.76	- 9.75	- 9.75	- 9.51	- 9.51
-108.52	-107.72	-116.49	- 98.62	-104.37	-115.24	-120.73

```
C     PROGRAMM ZUR BERECHNUNG VON WECHSELWIRKUNGSENERGIEN.(KCAL)     03
C     AUSGERICHTET FUER 2 H-BRUECKEN
C     LIT.:PURINE AMINO ACID HYDROGEN BONDING INTERACTIONS AND
C     SUGGESTIONS FOR MODELLING THE LAC OPERATOR REPRESSOR SYSTEM
C     ROMAN GARDUNO,KAREN HAYDOCK,ROEBERT D.MACELROY AND ROBERT REIN
C     QUANTUM CHEMISTRY IN BIOMEDICAL SCIENCES S.281
C     H. WEINSTEIN , J.D. GREEN , EDS.,
C     ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES VOL.367  1981
C     DIE PARAMETER STAMMEN AUS:
C      A.J. HOPFINGER
C      CONFORMATIONAL PROPERTIES OF MACROMOLECULES S.38-131
C      ACADEMIC PRESS N.Y.  1973
C      R.F.MCGUIRE,F.A.MOMANY,H.A.SCHERAGA
C      ENERGY PARAMETERS IN POLYPEPTIDES V. AN EMPERICAL HYDROGEN BOND
C      POTENTIAL FUNCTION BASED ON MOLECULAR ORBITAL CALCULATIONS.
C      THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY,VOL76.NO3,1972 375-393
C      NZ1=ANZAHL DER ATOME DES ERSTEN MOLEKUELS
C      NZ2=ANZAHL DER ATOME DES ZWEITEN MOLEKUELS
C      NBO1=ANZAHL DER ATOME DES ERSTEN MOLEKUELS OHNE DIE AN DER
C      H-BRUECKE BETEILIGTEN ATOME
C      NBO2=ANZAHL DER ATOME DES ZWEITEN MOLEKUELS OHNE DIE AN DER
C      H-BRUECKE BETEILIGTEN ATOME
C      E=DIELEKTRIZITAETSKONSTANTE
C      M1(I)=ORDNUNGSZAHL DER ATOME
C      XI(I),X2(I),X3(I)=KOORDINATEN DES ERSTEN MOLEKUELS
C      Q1(I)=DIE NACH DEM CNDO/2 ERRECHNETE LADUNG DES ATOMS
C      NBI(I)= PARAMETER FUER DIE ATOME ZUR BERECHNUNG DER E-NONBOND
C      NB KOEFFIZIENTEN DER ATOME:H(AL)=1,H(AR)=2,C(SP2)=3,C(SP3)=4
C      N(SP2)=5,N(SP3)=6,O(SP)=7,O(SP2)=8,F=9,CL=10,P=11,S=12
C      M2(J),X2(J),Y2(J),Z2(J),Q2(J),NB2(J) SYMBOLE ANALOG M1(I) USW.
C      FUER DAS ZWEITE MOLEKUEL
C      AK1=H-BRUECKENPARAMETER FUER DEN AKZEPTOR
C      BK1=H-BRUECKENPARAMTER FUER DAS H-ATOM
C      XX1,YY1,ZZ1,XX2,YY2,ZZ2, KOORDINATEN DES AKZEPTORS UND DES H-ATOMS
C      AK2,BK2,XX3 USW. SYMBOLE FUER DIE ZWEITE H-BRUECKE ANALOG AK1 USW.
C      DIE ANGABEN FUER DIE ATOME,DIE AN H-BRUECKEN BETEILIGT SIND,
C      MUESSEN IMMER AM ENDE DES ATOMSATZES FUER EIN MOLEKUEL AUFGEFUEHRT
C      WERDEN
       DIMENSION M1(70),X1(70),Y1(70),Z1(70),NB1(70),Q1(70)
       DIMENSION M2(70),X2(70),Y2(70),Z2(70),NB2(70),Q2(70)
       DIMENSION A(12,12),B(12,12)
       DIMENSION XA1(70),YA1(70),ZA1(70),XA2(70),YA2(70),ZA2(70)
       DATA A(1,1)/64.77/,A(1,2)/34.17/,A(2,1).34.17/,A(2,2)/18.87/,A(1,
     13)/165.8/,A(1,4)/127.4/,A(1,5)/124.9/,A(1,6)/128.3/,A(1,7)/128.
     25/,A(1,8)/123.9/,A(2,3)/165.8/,A(2,4)/127.4/,A(2,5)/124.9/,A(2,6)/12
     33/,A(2,7)/128.5/,A(2,8)/123.9/,A(3,1)/165.8/,A(3,2)/165.8/,A(3,
     43)/600.2/,A(3,4)/465.4/,A(3,5)/571,4/,A(3,6)/453,7/,A(3,7)/452.
     54/,A(3,8)/441.9/,A(4,1)/127.4/,A(4,2)/127.4/,A(4,3)/465.3/,A(4,
     64)/372,5/,A(4,5)/366.4/,A(4,6)/348.7/,A(4,7)/346.1/,A(4,8)/367.
     72/,A(5,1)/124.9/,A(5,2)/124.9/,A(4,3)/571.4/,A(5,4)/366.4/,A(5,
     85)/362.9/,A(5,6)/346.1/,A(5,7)/344.3/,A(5,8)/365.0/,A(6,1)/128.
     93/,A(6,2)/128.3/,A(6,3)/453.7/,A(6,4)/348.7/,A(6,5)/346.1/,A(6,
     16)/344.7/,A(6,7)/344.7/,A(6,8)/349.5/,A(7,1)/128.5/,A(7,1)/128.
     25/,A(7,3)/452.5/,A(7,4)/346.1/,A(7,5)/344.3/,A(7,6)/344.7/,A(7,
     47)/344.8/,A(7,8)/348.7/,A(8,1)/123.9/,A(8,2)/123.9/,A(8,3)/461.
     59/,A(8,4)/367.2/,A(8,5)/365.0/,A(8,6)/349.5/,A(8,7)/348.7/,A(8,
     68)/367.2/,A(1,9)/79.8/,A(2,9)/79.8/,A(3,9)/284.5/,A(4,9)/223.2
     70/,A(5,9)/222.4/,A(6,9)/218.7/,A(7,9)/219.6/,A(8,9)/221.8/,A(9,
     89)/134.6/,A(9,10)/457.6/,A(9,11)/446.5/,A(9,12)/474.7/,A(1,10)/27
```

```
92.8/,A(2,10)/272.8/,A(3,10)/967.4/,A(4,10)/759.3/,A(5,10)/738.8/
1,A(6,10)/735.3/,A(7,10)/733.7/,A(8,10)/753.2/,A(9,10)/457.6/,
2A(10,10)/1562./,A(11,10)/1512./,A(12,10)/1608./,A(1,11)/264.8/,
3A(2,11)/264.8/,A(3,11)/938.5/,A(4,11)/742.6/,A(5,11)/733.3/,A(6,
411)/712.6/,A(7,11)/713.0/,A(8,11)/738.7/,A(9,11)/446.5/,A(10,11)/
51512./,A(11,11)/1473./,A(12,11)/1563./,A(1,12)/290.2/,A(2,12)/29
60.2/,A(3,12)/1076./,A(4,12)/845.9/,A(5,12)/1038./,A(6,12)/748.5/,
7A(7,12)/755.2/,A(8,12)/780.3/,A(9,12)/474.7/,A(10,12)/1608./,A(11,
812)/1563./,A(12,12)/1685./,A(9,1)/79.8/,A(10,1)/272.8/,A(11,1)/26
4.8/,A(12,1)/290.2/,A(9,2)/79.8/,A(10,2)/272.8/,A(11,2)/264.8/,A(1
12,2)/290.2/,A(9,3)/284.5/,A(10,3)/967.4/,A(11,3)/938.5/,A(12,3)/
21076./,A(9,4)/223.2/,A(10,4)/759.3/,A(11,4)/742.6/,A(12,4)/845.9/
3,A(9,5)/222.4/,A(10,5)/738.8/,A(11,5)/733.3/,A(12,5)/1038./,A(9,6)
4/218.7/,A(10,6)/735.3/,A(11,6)/712.6/,A(12,6)/748.5/,A(9,7)/219.6/
5,A(10,7)/733.7/,A(11,7)/713.0/,A(12,7)/755.2/,A(9,8)/221.8/,A(10,8
6)/753.2/,A(11,8)/738.7/,A(12,8)/780.3/
 DATA B(1,1)/5.352/,B(1,2)/1.469/,B(2,1)/1.469/,B(2,2)/0.4436/,B(1,
13)/1.924/,B(1,4)/3.743/,B(1,5)/2.71/,B(1,6)/1.995/,B(1,7)/1.3
291/,B(1,8)/2.503/,B(2,3)/1.924/,B(2,4)/3.743/,B(2,5)/2.71/,B(2,
36)/1.995/,B(2,7)/1.391/,B(2,8)/2.503/,B(3,1)/1.924/,B(3,2)/1.9
424/,B(3,3)/19.62/,B(3,4)/19.7/,B(3,5)/14.5/,B(3,6)/12.16/,B(3,
57)/9.753/,B(3,8)/11.48/,B(4,1)/3.743/,B(4,2)/3.743/,B(4,3)/19.7
60/,B(4,4)/28.58/,B(4,5)/21.63/,B(4,6)/16.82/,B(4,7)/8.65/,B(4,
78)/20.52/,B(5,1)/27.1/,B(5,2)/27.1/,B(5,3)/14.5/,B(5,4)/21.6
83/,B(5,5)/16.09/,B(5,6)/10.58/,B(5,7)/6.085/,B(5,8)/15.28/,B(6,
91)/1.995/,B(6,2)/1.995/,B(6,3)/121.6/,B(6,4)/16.82/,B(6,5)/10.5
18/,B(6,6)/17.82/,B(6,7)/12.38/,B(6,8)/15.75/,B(7,1)/1.391/,B(7,
22)/1.391/,B(7,3)/9.753/,B(7,4)/8.65/,B(7,5)/6.085/,B(7,6)/12.3
38/,B(7,7)/7.448/,B(7,8)/75.38/,B(8,1)/25.03/,B(8,2)/25.03/,B(8,
43)/11.48/,B(8,4)/20.52/,B(8,5)/15.28/,B(8,6)/15.75/,B(8,7)/7.5
538/,B(8,8)/14.49/,B(9,1)/0.9361/,B(10,1)/8.074/,B(11,1)/7.825/
6,B(12,1)/30.28/,B(9,2)/0.9361/,B(10,2)/8.074/,B(11,2)/7.825/,B(
712,2)/30.28/,B(9,3)/8.861/,B(10,3)/55.42/,B(11,3)/54.61/,B(12,3)
8/268.8/,B(9,4)/10.07/,B(10,4)/64.64/,B(11,4)/62.83/,B(12,4)/225.1
9/,B(9,5)/4.755/,B(10,5)/37.31/,B(11,5)/3..44/,B(12,5)/189.5/,B(9,6
1)/6.452/,B(10,6)/51.83/,B(11,6)/50.65/,B(12,6)/179.2/,B(9,7)/4.256
2/,B(10,7)/36.93/,B(11,7)/32.69/,B(12,7)/132.5/,B(9,8)/5.571/,B(10,
38)/36.71/,B(11,8)/36.15/,B(12,8)/136.2/,B(1,9)/0.9361/,B(2,9)/
40.9361/,B(3,9)/8.861/,B(4,9)/10.07/,B(5,9)/4.755/,B(6,9)/6.452/
5,B(7,9)/4.256/,B(8,9)/5.571/,B(9,9)/3.652/,B(10,9)/29.67/,B(11,9)
6/29.04/,B(12,9)/106.4/,B(1,10)/8.074/,B(2,10)/8.074/,B(3,10)/55.42
7/,B(4,10)/64.64/,B(5,10)/37.31/,B(6,10)/51.83/,B(7,10)/36.93/,B(8,
810)/36.71/,B(9,10)/29.67/,B(10,10)/200.5/,B(11,10)/153.7/,B(12,10)
9/585.1/,B(1,11)/7.825/,B(2,11)/7.825/,B(3,11)/54.61/,B(4,11)/62.83
1/,B(5,11)/35.44/,B(6,11)/50.65/,B(7,11)/32.69/,B(8,11)/36.15/,B(9,
211)/29.04/,B(10,11)/153.7/,B(11,11)/170.7/,B(12,11)/513.4/,B(1,12)
3/30.28/,B(2,12)/30.28/,B(3,12)/268.8/,B(4,12)/225.1/,B(5,12)/189.5
4/,B(6,12)/179.2/,B(7,12)/132.5/,B(8,12)/136.2/,B(9,12)/106.4/,B(10
5,12)/585.1/,B(11,12)/513.4/,B(12,12)/1383./
 OPEN (UNIT=5,DEVICE='DSK',FILE='WWIN.DAT',ACCESS='SEQIN',
1MODE='ASCII')
 OPEN (UNIT=6,DEVICE='DSK',FILE='WWOUT.DAT',ACCESS='SEQOUT',
1MODE='ASCII')
 READ(5,60)NZ1,NZ2,NB01,NB02,E
 WRITE(6,60)NZ1,NZ2,NB01,NB02,E
60 FORMAT(4I3,F5.1)
```

```
READ(5,33)(M1(I),X1(I),Y1(I),Z1(I),Q1(I),NB1(I),I=1,NZ1)
WRITE(6,33)(M1(I),X1(I),Y1(I),Z1(I),Q1(I),NB1(I),I=1,NZ1)
FORMAT(2X,I2,F11.6,2F15.6,F10.6,1X,I2)
READ(5,33)(M2(J),X2(J),Y2(J),Z2(J),Q2(J),NB2(J),J=1,NZ2)
WRITE(6,33)(M2(J),X2(J),Y2(J),Z2(J),Q2(J),NB2(J),J=1,NZ2)
DO 14 I=1,NZ1
IF(M1(I).EQ.8)GO TO 25
IF(M1(I).EQ.7)GO TO 64
IF(M1(I).EQ.6)GO TO 45
IF(M1(I).EQ.1)GO TO 55
IF(M1(I).EQ.9)GO TO 66
IF(M1(I).EQ.15)GO TO 77
IF(M1(I).EQ.16)GO TO 88
IF(M1(I).EQ.17)GO TO 98

Q1(I)=Q1(I)-6.
GO TO 11
Q1(I)=Q1(I)-5.
GO TO 11
Q1(I)=Q1(I)-4.
GO TO 11
Q1(I)=Q1(I)-1.
GO TO 11
Q1(I)=Q1(I)-7.
GO TO 11
Q1(I)=Q1(I)-5.
GO TO 11
Q1(I)=Q1(I)-6.
GO TO 11
Q1(I)=Q1(I)-7.
GO TO 14
 CONTINUE
DO 102 J=1,NZ2
IF(M2(J).EQ.8) GO TO 100
IF(M2(J).EQ.7) GO TO 110
IF(M2(J).EQ.6) GO TO 120
IF(M2(J).EQ.1) GO TO 130
IF(M2(J).EQ.9) GO TO 140
IF(M2(J).EQ.15) GO TO 150
IF(M2(J).EQ.16) GO TO 160
IF(M2(J).EQ.17) GO TO 170
Q2(J)=Q2(J)-6
GO TO 99
Q2(J)=Q2(J)-5.
GO TO 99
Q2(J)=Q2(J)-4.
GO TO 99
Q2(J)=Q2(J)-1.
GO TO 99
Q2(J)=Q2(J)-7.
GO TO 99
Q2(J)=Q2(J)-5.
GO TO 99
Q2(J)=Q2(J)-6.
GO TO 99
Q2(J)=Q2(J)-7.
 GO TO 102
CONTINUE
```

```
      DO 501 I=1,NZ1
      XA1(I)=X1(I)/.529
      YA1(I)=Y1(I)/.529
      ZA1(I)=Z1(I)/.529
      CONTINUE
      DO 502 J=1,NZ2
      XA2(J)=X2(J)/.529
      YA2(J)=Y2(J)/.529
      ZA2(J)=Z2(J)/.529
    2 CONTINUE
      EEL= 0.0
      DO 9 I=1,NZ1
      DO 9 J=1,NZ2
      R=SQRT((XA1(I)-XA2(J))**2+(YA1(I)-YA2(J))**2+(ZA1(I)-ZA2(J))**2)
      EEL=EEL+((Q1(I)*Q2(J))/(E*R))*627.5
       FUER GELADENE MOLEKUELE IST E DURCH (6R-15) ERSETZT.
       DIE UNTERSTE GRENZE FUER DIE DIELEKTRIZITAETSKONSTANTE IST 1.
    9 CONTINUE
      WRITE (6,666)EEL
    6 FORMAT (F15.10)
      ENB=0.0
      EHK=0.0
      DO 7 I=1,NB01
      DO 7 J=1,NB02
      R=SQRT((X1(I)-X2(J))**2+(Y1(I)-Y2(J))**2+(Z1(I)-Z2(J))**2)
      K=NB1(I)
      L=NB2(J)
      IF(K.GE.3) GO TO 2
      IF(L.LE.2) GO TO 1
    2 ENB=ENB+(0.0001*(B(K,L)/R**12)-A(K,L)/R**6)
      GO TO 7
    1 EHK=EHK+(0.001*(B(K,L)/R**12)-A(K,L)/R**6)
    7 CONTINUE
      ELEC=0.0
      ELEC=ELEC+ENB+EHK
      WRITE (6,991)ENB,EHK
    1 FORMAT(2F15.6)
      READ(5,600)AK1,BK1
      WRITE(6,600)AK1,BK1
      READ(5,395) XX1,YY1,ZZ1,XX2,YY2,ZZ2
      WRITE(6,395)XX1,YY1,ZZ1,XX2,YY2,ZZ2
    5 FORMAT(3F15.6/3F15.6)
      RZ=0.0
      RZ=0.0+SQRT((XX1-XX2)**2+(YY1-YY2)**2+(ZZ1-ZZ2)**2)
      EH1=0.0
      EH1=EH1+(AK1/RZ**12-BK1/RZ**10)
      READ(5,600)AK2,BK2
      WRITE(6,600)AK2,BK2
    3 FORMAT(2F15.6)
      READ(5,395)XX3,YY3,ZZ3,XX4,YY4,ZZ4
      WRITE(6,395) XX3,YY3,ZZ3,XX4,YY4,ZZ4
      RY=0.0
      RY=RY+SQRT((XX3-XX4)**2+(YY3-YY4)**2+(ZZ3-ZZ4)**2)
      EH2=0.0
      EH2=EH2+(AK2/RY**12-BK2/RY**10)
      WRITE(6,199)EH1,EH2
    9 FORMAT(2F15.6)
      ETOT=EEL+ELEC+EH1+EH2
      WRITE(6,6)
    6 FORMAT(6X,4HE-EL,8X,9HE-NONBOND,3X,9HE-H-BOND1,3X,9HE-H-BOND2,6X,
     1 5HTOTAL)
       WRITE(6,71)EEL,ELEC,EH1,EH2,ETOT
    1 FORMAT(F15.6,3F12.6,F15.6)
      STOP
      END
```

H LITERATUR

1 H. Beyer
Lehrbuch der organischen Chemie
S. Hirzel Verlag, Stuttgart 1976

2 H. Auterhoff,
Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1978

3 G.H. Hitchings, G.B. Elion, H. Vander Werff, E.A. Falco
J. Biol. Chem. 174, 765 (1948)

4 S. Farber, L.K. Diamond, R.D. Mercer, R.J.Jr. Sylvester, J.A., Wolff
New Engl. J. Med. 238, 787 (1948)

5 C.A. Nichol, A.D. Welch
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74, 403 (1950)

6 S.F. Zakrzewski, C.A. Nichol
Biochim. Biophys. Acta 27, 425 (1958)

7 S. Futtermann
J. Biol. Chem. 228, 1031 (1958)

8 G.C.K. Roberts
Drug Action on Molecular Level
G.C.K. Roberts, Ed.,
Macmillian Press, London 1977

9 G.H. Hitchings
Cancer Research 29, 1895 (1969)

10 J.J. Burchall, G.H. Hitchings
Mol. Pharmacol. 1, 126 (1965)

11 E. Mutschler
Arzneimittelwirkungen
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1981

12 W. Forth, D. Henschler, W. Rummel
Pharmakologie und Toxikologie
Bibliographisches Institut AG, Zürich 1980

13 E.J. Pastore, L.T. Plante, R.L. Kisliuk
Met. Enzymol. 24, 281, 1974

14 E.L. Gundersen, R.B. Dunlap, N.G.L. Harding,
J.H. Freisheim, F. Otting, F.M. Huennekens
Biochemistry 11, 1018 (1972)

15 M. Poe, N.J. Greenfield, J.M. Hirshfield,
M.N. Williams, K. Hoogsteen
Biochemistry 11, 1023 (1972)

16 K.E. Batley, H.R. Morris
Biochem. Soc. Transact. 5, 1097 (1977)

17 D. Stone, A.W. Phillips
FEBS Letters 74, 85 (1977)

18 K.E. Batley, H.R. Morris
Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 1010 (1977)

19 K.G. Bitar, D.T. Blankenship, K.A., Walsh
R.B. Dunlap, A.V. Reddy, J.H. Freisheim
FEBS Letters 80, 119 (1977)

20 D. Stone, A.W. Phillipps, J.J. Burchall
Eur. J. Biochem. 72, 613 (1977)

21 D.A. Matthews, R.A. Alden, J.T. Bolin, D.J. Filman,
S.T. Freer, R. Hamlin, W.G.J. Hol, R.L. Kisliuk,
E.J. Pastore, L.T. Plante, N.H. Xuong, J. Kraut
J. Biol. Chem. 253, 6946 (1978)

22 D.A. Matthews, R.A. Alden, J.T. Bolin, D.J. Filman,
S.T. Freer, N.H. Xuong, J. Kraut
Chemistry and Biology of Pteridines, pp. 465
R.L. Kisliuk, G.M. Brown, Eds.,
Elsevier/North Holland, New York 1979

23 D.A. Matthews, R.A. Alden, J.T. Bolin, S.T. Freer,
R. Hamlin, N.H. Xuong, J. Kraut, M. Poe, M. Williams,
K. Hoogsteen
Science 197, 452 (1977)

24 D.J. Baker, C.R. Beddell, J.N. Champness,
P.J. Goodford, F.E.A. Norrington, D.R. Smith,
D.K. Stammers
FEBS Letters 126, 49 (1981)

25 K.W. Volz, D.A. Matthews, R.A. Alden, S.T. Freer,
C. Hansch, B.T. Kaufman, J. Kraut
J. Biol. Chem. 257, 2528 (1982)

26 C. Silipo, C. Hansch
J. Am. Chem. Soc. 97, 6849 (1975)

27 C. Hansch, J.Y. Fukunaga, P.Y.C. Jow
J. Med. Chem. 20, 96 (1977)

28 S.W. Dietrich, J.M. Blaney, M.A. Reynolds,
P.Y.C. Jow, C. Hansch
J. Med. Chem. 23, 1205 (1980)

29 A.J. Hopfinger
Arch. Biochem. Biophys. 206, 153 (1981)

30 A.J. Hopfinger
J. Am. Chem. Soc. 102, 7196 (1980)

31 P.G. Abdul-Ahad, G.A. Webb
Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther. 17, 219 (1982)

32 Ren-li-Li, C. Hansch, D. Matthews, J.M. Blaney,
R. Langridge, T.J. Delcamp, S.S. Susten,
J.H. Freisheim
QSAR 1, 1 (1982)

33 A. Lehninger
Biochemie
Verlag Chemie, Weinheim 1975

34 D.J. Filman, J.T. Bolin, D.A. Matthews, J. Kraut
J. Biol. Chem. 257, 13663 (1982)

35 R.L. Blakley
The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines,
p. 219,
Amsterdam, North Holland 1969

36 G.H. Hitchings, B. Roth
Enzyme Inhibitors as Drugs, pp. 263,
M. Sandler, Ed.,
University Park Press, Baltimore 1980

37 J.J. Burchall
The Journal of Infectious Diseases 128, 437 (1973)

38 E. Buddecke
Grundriss der Biochemie
De Gruyter, Berlin-New York 1974

39 R. Ferone, J.J. Burchall, G.H. Hitchings
Mol. Pharmacol. 5, 49 (1969)

40 D.P. Baccanari, D. Stone, L. Kuyper
J. Biol. Chem. 256, 1738 (1981)

41 D. Baccanari, A. Phillips, S. Smith, D. Sinski,
J. Burchall
Biochemistry 14, 5267 (1975)

42 C.D. Bennett
Nature (Lond.) 248, (1974)

43 C.D. Bennett, J.A. Rodkey, J.M. Somdey,
R.H. Hirschman
Biochemistry 17, 1328 (1978)

44 J.M. Gleisner, D.L. Peterson, R.L. Blakley
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 71, 3001 (1974)

45 D. Stone, S.J. Paterson, J.H. Raper, A.W. Phillips,
J. Biol. Chem. 254, 480 (1979)

46 S.L. Smith, P. Patrick, D. Stone, A.W. Phillips,
J.J. Burchall
J. Biol. Chem. 254, 11475 (1979)

47 P.H. Lai, Y.C. Pan, J.M. Gleisner, D.L. Peterson, R.L. Blakley
Chemistry and Biology of Pteridines, pp. 437
R.L. Kisliuk, G.M. Brown, Eds,
Elsevier/North Holland, New York 1979

48 A.A. Kumar, D.T. Blankenship, B.T. Kaufman, J.H. Freisheim
Biochemistry 19, 667 (1980)

49 J.T. Bolin, D.J. Filman, D.A. Matthews, R.C. Hamlin, J. Kraut
J. Biol. Chem. 257, 13650 (1982)

50 E. Keller
Chemie in unserer Zeit 16, 71 (1982)

51 J. Pichworth Glusher, K.N. Trueblood
Crystal Structure Analyses, pp. 96
A. Primer Ed.,
Oxford University Press, London 1972

52 M. Levitt, C. Chothia
Nature (Lond.) 261, 552 (1976)

53 R.E. Dickerson, I. Geis
Struktur und Funktion der Proteine
Verlag Chemie, Weinheim 1971

54 J.S. Richardson, E.D. Getzoff, D.C. Richardson
Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 2574 (1978)

55 J.C. Fontecilla-Camps, C.E. Bugg
Chemistry and Biology of Pteridines, pp. 235
R. L. Kishuk, G.M. Brown Eds.,
Elsiever/North Holland, New York 1979

56 J.C. Fontecilla-Camps, C.E. Bugg, C. Temple, Jr., J.D. Rose, J.A. Montgomery, R.L. Kisliuk
J. Am. Chem. Soc. 101, 6114 (1979)

57 P.A. Charlton, D.W. Young, B. Birdsall, J. Feeney, G.C.K. Roberts
J. Chem. Soc. Chem. Commun. 922 (1979)

58 J.M. Spark, D.A. Winkler, P.R. Andrews
Int. J. Quantum Chem., Symp. Quantum Biol. 9, 321 (1982)

59 P.F. Cook, N.J. Oppenheimer, W.W. Cleland
Biochemistry 20, 1817 (1981)

60 D.S. Sigman, J. Hajdu, D.J. Creighton
Bioorganic Chemistry, Vol IV, pp. 385
E.E. van Tamelen, Ed.,
Academic Press, New York 1978

61 D. Perahia, B. Pullmann, A. Saran
Structure and Conformation of Nucleic Acid and Protein-Nucleic Acid Interactions, pp. 685
M. Sundaralingam, S.T. Rao, Eds.,
University Park Press, Baltimore 1975

62 W. Saenger, B.S. Reddy, K. Muhlegger, G. Weimann
Nature (Lond.) 267, 225 (1977)

63 A. Korolkovas
Grundlagen der molekularen Pharmakologie und der Arzneimittelwirkung, S. 193
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974

64 S.F. Zakrzewski
J. Biol. Chem. 238, 1485 (1963)

65 S.F. Zakrzweski
J. Biol. Chem. 238, 4002 (1963)

66 H.-D. Höltje, L.B. Kier
J. Med. Chem. 17, 814 (1974)

67 H.-D. Höltje, L.B. Kier
J. Pharm. Sci. 63, 1722 (1974)

68 H.-D. Höltje
Arch. Pharm. 308, 438 (1975)

69 H.-D. Höltje
Arch. Pharm. 309, 480 (1976)

70 H.-D. Höltje, L. Vogelgesang
Arch. Pharm. 312, 578 (1979)

71 H.-D. Höltje, P. Baranowski
Arch. Pharm. 316, 154 (1983)

72 R. Mannhold
persönl. Mitteilung, Universität Düsseldorf

73 M. Tintelnot
persönl. Mitteilung, Universität Frankfurt/M.

74 H. Simon
Dissertation Frankfurt/M., 1982

75 G.C.K. Roberts, J. Feeney, A.S.V. Burgen,
V. Yuferov, J.G. Dann, R. Bjur
Biochemistry 13, 5351 (1974)

76 A. Gronenborn, B. Birdsall, E.I. Hyde, G.C.K. Roberts, J. Feeney, A.S.V. Burgen
Nature (Lond.) 290, 273 (1981)

77 J.W. Williams, J.F. Morrison, R.G. Duggleby
Biochemistry 18, 2567 (1979)

78 M. Chaykovsky, A. Rosowsky, N. Papathanasopoulos, K.K.N. Chen, E.J. Modest, R.L. Kisliuk, Y. Gaumont
J. Med. Chem. 17, 1212 (1974)

79 K. Rosowsky, K.K.N. Chen
J. Med. Chem. 17, 1308 (1974)

80 J.G. Dann, G. Ostler, R.A. Bjur, R.W. King, P. Scudder, P.C. Turner, G.C.K. Roberts, A.S.V. Burgen
Biochem. J. 157, 559 (1976)

81 D.A. Matthews
Biochemistry 18. 1602 (1979)

82 Protein Data Bank
Cambridge, England

83 C. Johnson
Ortep-Programm

84 S. Nir
Build-Programm

85 J.W. Bats, H. Fuess
Acta Cryst. B38, 1004 (1982)

86 F.E. Harris
IEHT-Programm

87 R. Hoffmann
J. Chem. Phys. 39, 1397 (1963)

88 J.M. Stewart, G.J. Kruger, H.L. Ammon, C. Dickinson, S.R. Hall
Programm X-RAY, Maryland University, 1972

89 L.E. Sutton, Ed.,
Tables of Interatomic Distances and Configuration in Molecules and Ions.
Special Publication No. 11
The Chemical Society, London 1958

90 Special Publication No. 18
The Chemical Society, London 1965

91 QCPE No. 136
Coord-Programm

92 E. Heilbronner, H. Bock
Das HNO-Modell und seine Anwendung, Bd. 3, S.25
Verlag Chemie, Weinheim 1968

93 QCPE No. 139
Walkur-Programm

94 M. Poe
J. Biol. Chem. 248, 7025 (1973)

95 M. Poe
J. Biol. Chem. 252, 3722 (1977)

96 C. Hèlène
FEBS Letters 74, 10 (1977)

97 H. Sellini, J.C. Maurizot, J.L. Dimicoli, C. Hèlène
FEBS-Letters 17, 73 (1973)

98 K. Hood, G.C.K. Roberts
Biochem. J. 171, 357 (1978)

99 D.D. Saperstein, A.J. Rein, M. Poe, M.F. Leahy
J. Am. Chem. Soc. 100, 4296 (1978)

100 Y. Ozaki, R.W. King, P.R. Carey
Biochemistry 20, 3972 (1981)

101 L. Cocco, J.P. Groff, Jr., J.A. Montgomery,
R.E. London, N.A. Matwiyoff
Biochemistry 20, 3972 (1981)

102 L. Cocco, C. Temple, C., Jr., J.A. Montgomery,
R.E. London, R.L. Blakley
Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 413 (1981)

103 G.C.K. Roberts, J. Feeney, A.S.V. Burgen, S. Daluge
FEBS-Letters 131, 85 (1981)

104 S. Subramanian, B.T. Kaufman
Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 3201 (1978)

105 J.A. Pople, D.P. Santry, G.A. Segal
J. Chem. Phys. 43, 129 (1965)

106 J.A. Pople, G.A. Segal
J. Chem. Phys. 43, 136 (1965)

107 J.A. Pople, G.A. Segal
J. Chem. Phys. 44, 3289 (1966)

108 P.A. Kollmann, L.C. Allen
Chem. Rev. 72, 283 (1972)

109 C.N.R. Rao, A. Goel, K.G. Rao, S.N.N. Murthy
J. Phys. Chem. 75, 1744 (1971)

110 A. Karpfen, J. Ladik, P. Russegger, P. Schuster,
S. Suhai
Theor. Chim. Acta 34, 115 (1974)

111 H.R. Christen
Grundlagen der allgemeinen und anorganischen Chemie
Verlag Sauerländer, Aarau Diesterweg Salle,
Frankfurt/M. 1973

112 Merk Index 9, 3219

113 R. Rein, G.A. Clarke, F.E. Harris
Quantum Aspects of Heterocyclic Compounds in Chemistry
and Biochemistry, pp. 86
Bergmann u. Pullman, Eds.,
The Israeli Academy of Sciences and Humanities,
Jerusalem 1970

114 T.J. Swissler, R. Rein
Chem. Phys. Letters 15, 617 (1972)

115 J.R. Rabinowitz, R. Rein
Int. J. Quantum Chem. 6, 669 (1972)

116 J.R. Rabinowitz, T.J. Swissler, R. Rein
Int. J. Quantum Chem. 6, 353 (1972)

117 H. Ratajczak, W.J. Orville-Thomas
Molekular Interactions, pp.1
H. Ratajczak, W.J. Orville-Thomas, Eds.,
John Wiley, New York 1980

118 R. Rein, M. Shibita
Intermolecular Forces, pp. 49
B. Pullman, Ed.,
D. Reidel Publishing Company, 1981

119 A.I. Kitaygorodski
Tetrahedron 14, 230 (1961)

120 R. Garduno, K. Haydock, R.D. MacElroy, R. Rein
Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol. 387,
Quantum Chemistry in Biomedical Sciences, pp. 281
H. Weinstein, J.P. Green, Eds.,
The New York Academy of Sciences, New York 1981

121 P.A. Kollman, P.K. Weiner, A. Dearing
Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol. 387,
Quantum Chemistry in Biomedical Sciences, pp. 250
H. Weinstein, J.P. Green, Eds.,
The New York Academy of Sciences, New York 1981

122 J.L. Webb
Enzyme and Metabolic Inhibitors, Vol.1
Academic Press, New York 1963

123 A.J. Hopfinger
Conformational Properties of Macromolecules pp. 38
Academic Press, New York and London 1973

124 R.F. McGuire, F.A. Momany, H.A. Scheraga
J. Phys. Chem. 76, 375 (1972)

125 R. Rein
Intermolecular Interactions, pp. 307
B. Pullman, Ed.,
John Wiley, New York 1978

126 A. Gronenborn, B. Birdsall, E. Hyde, G. Roberts,
J. Feeney, A. Burgen
Mol. Pharmacol. 20, 145 (1981)

127 B. Birdsall, A. Gronenborn, E.I. Hyde, G.M. Clore,
G.C.K. Roberts, J. Feeney, A.S.V. Burgen
Biochemistry 21, 5831 (1982)

128 B. Birdsall, A. Gronenborn, G.M. Clore, G.C.K. Roberts,
J. Feeney, A.S.V. Burgen
Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 1139 (1981)

129 A. Gronenborn, B. Birdsall, E.I. Hyde, G.C.K. Roberts,
J. Feeney, A.S.V. Burgen
Biochemistry 20, 1717 (1981)

130 R.L. Blakley, J.F. Morrison
Proceedings of the Fourth International Symposium of
Pteridines, pp. 315, 1970

131 J.W. Williams, R.G. Duggleby, R. Cutler, J.F. Morrison
Biochem. Pharmacol. 29, 589 (1980)

132 C. Sungman
Biochem. Pharmacol. 24, 2177 (1975)

133 C. Sungman, S.Y.R. Kim, S.G. Kornstein, P.W. Kantoff,
K.H. Kim, F.N.M. Naguib
Biochem. Pharmacol. 30, 1507 (1981)

134 J.W. Williams. J.F. Morrison
Methods Enzymol. 63, 437 (1979)

135 J.F. Morrison
persönl. Mitteilung
John Curtin School of Medical Research, Canberra, Australia

136 M. Chauvet, M. Bourdeaux, C. Briand, M. Dell'Amico, R. Gilli, M. Diarra
Biochem. Pharmacol. 32, 1059 (1983)

Lebenslauf

Am 5.2.1956 wurde ich als drittes Kind des Landwirtes Johann Zunker und seiner Ehefrau Erna, geborene Haubrich, in Wittlich (Eifel) geboren. Aufgewachsen bin ich in Heckenmünster (Eifel). Ab 1962 besuchte ich die Volksschule Dodenburg, von wo ich 1969 auf das Staatl. Aufbaugymnasium Wittlich überwechselte. Im Mai 1975 legte ich an dieser Schule die Reifeprüfung ab.

Von Juli 1975 bis September 1976 leistete ich in der Bundeswehr den Grundwehrdienst ab. An der Universität des Saarlandes in Saarbrücken studierte ich von Oktober 1976 bis Mai 1980 Pharmazie. Den Ersten Abschnitt zur Pharmazeutischen Prüfung bestand ich im September 1978, den Zweiten Abschnitt im Mai 1980. Das anschließende Pharmaziepraktikum absolvierte ich in der Burgtor-Apotheke in Wittlich und am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt. Nach bestandener Prüfung zum Dritten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung erhielt ich die Approbation als Apotheker im Juni 1981.

Im Dezember 1980 begann ich unter Anleitung von Prof. Dr. H.-D. Höltje am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt meine Promotionsarbeit.